



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Unidad de Posgrado

**Maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos de
Vicugna pacos “alpaca”**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Biotecnología

AUTOR

Eric Steve RAMOS MAGUIÑA

ASESORES

Amparo Iris ZA VALETA PESANTES

Martha Esther VALDIVIA CUYA

Lima, Perú

2009



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Ramos, E. (2009). *Maduración y fertilización in vitro de ovocitos de Vicugna pacos "alpaca"*. [Tesis de maestría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	1
SUMMARY	2
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES	5
MATERIALES Y MÉTODOS	25
RESULTADOS	31
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	44
CONCLUSIÓN	50
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
ANEXOS	63

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi sincero agradecimiento a mis asesoras de tesis: Dra. Amparo Zavaleta y principalmente a la MSc. Martha Valdivia quien dirige el Laboratorio de Fisiología de la Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Biológicas-UNMSM, cuya asesoría constante fue fundamental en la realización del presente trabajo de investigación. Hago extensivo el agradecimiento al Dr. Jaime Ruiz, quien dirige el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Universidad Nacional de Huancavelica, por el apoyo en la obtención del material biológico y el permitirme la utilización de las instalaciones del mencionado laboratorio. Además, expreso mi agradecimiento a la Dra. Luisa Echevarría, Facultad de Medicina Veterinaria-UPCH, por el apoyo en la obtención del material biológico para el trabajo preliminar.

Un especial agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica CONCYTEC, entidad que subvencionó todo el desarrollo de la tesis.

DEDICATORIA

En primer lugar dedico esta tesis a Dios por darme su bendición y la perseverancia para desarrollar este arduo trabajo como parte de la investigación científica.

A mis Padres: Lucía y Raúl, por sus consejos y enseñanzas.

A mi hermano Dennis, por su apoyo incondicional y cariño.

RESUMEN

Durante la cópula, el folículo dominante de *Vicugna pacos* “Alpaca” no siempre es óptimo para la ovulación y fertilización, lo cual incrementa su deficiencia reproductiva. Los objetivos de este trabajo fueron madurar y fertilizar *in vitro* los ovocitos de alpacas. Los complejos cúmulos-ovocito (COC) colectados por aspiración folicular (n=158) fueron categorizados en Grado 1 (n=68, más de 4 capas de células de granulosa); Grado 2 (n=61, 2 ó 3 capas de células de granulosa); Grado 3 (n=4, capas de células disgregadas), y Grado 4 (n=25, sin células de granulosa y en total degeneración). La maduración *in vitro* se realizó en TCM-199 suplementado con suero fetal bovino (FCS) al 10%, hormona folículo estimulante (FSH) 0.02 UI/ml, piruvato de sodio (0.2 mM), gentamicina (50 µg/ml), 17β-estradiol (1 µg/ml), y en IVF suplementado con hCG (10 UI/ml) y 17β-estradiol (99 µg/ml). Se analizaron los ovocitos a las 26 horas de cultivo por la expansión de las células del cúmulus y/o la expulsión del primer cuerpo polar. La fertilización *in vitro* fue realizada en Fert-TALP suplementado con suero albúmina bovina (BSA), con los ovocitos madurados previamente, evaluados a partir de las 48 horas por la segmentación del cigoto. La tasa de maduración no mostró diferencia significativa ($p>0.05$) entre el número de ovocitos madurados en TCM-199 ($61/85 = 71.76\%$) e IVF ($31/44 = 70.45\%$) en relación a los COC de Grado 1 y 2. La tasa de fertilización no mostró diferencia significativa ($p>0.05$) en TCM-199 ($13/61 = 21.31\%$) e IVF ($6/28 = 21.43\%$). El sistema del cultivo *in vitro* de ovocitos de alpaca en IVF se puede emplear como herramienta biotecnológica para el manejo reproductivo ya que permite conseguir ovocitos maduros y fertilizados potencialmente viables.

SUMMARY

During the mating time, the dominant follicle of *Vicugna pacos* "Alpaca" is not always optimal for ovulation and fertilization, which increases its reproductive deficiency. The objectives of this study were to mature and fertilize alpaca's oocyte *in vitro*. Cumulus-oocyte complexes (COC) collected by follicular aspiration (n = 158) were categorized as Grade 1 (n = 68, more than 4 layers of granulose cells), Grade 2 (n = 61, 2 or 3 layers of granulose cells), Grade 3 (n = 4, layers of fragmented cells), and Grade 4 (n = 25 without granulosa cells and degenerated). The *in vitro* Maturation was performed in TCM-199 supplemented with fetal calf serum (FCS) 10%, follicle stimulating hormone (FSH) 0.02 UI/ml, sodium pyruvate (0.2 mm), gentamicin (50 µg/ml), 17β-estradiol (1 µg/ml), and IVF Medium supplemented with hCG (10UI/ml) and 17β-estradiol (99 µg/ml). Oocytes were analyzed at 26 hours of culture by the expansion of cumulus cells and / or expulsion of the first polar body. *In vitro* Fertilization was performed in Fert-TALP supplemented with bovine serum albumin (BSA), with pre-matured oocytes, as assessed from 48 hours for the segmentation of the zygote. The maturation rate did not show significant difference ($p>0.05$) between the number of oocytes matured in TCM-199 ($61/85 = 71.76\%$) and IVF ($31/44 = 70.45\%$) compared to the COC of Grade 1 and 2. The fertilization rate did not show significant difference ($p>0.05$) in TCM-199 ($13/61 = 21.31\%$) and IVF ($6/28 = 21.43\%$). The system of *in vitro* culture of alpaca's oocyte in IVF can be used as a biotechnological tool for reproductive management since it allows obtaining mature and fertilized oocytes potentially viable.

INTRODUCCIÓN

Los estudios en reproducción de camélidos muestran que la especie *Vicugna pacos* “Alpaca” presenta deficiencia reproductiva y una elevada mortalidad embrionaria, aproximadamente del 50% durante los primeros 30 días de gestación en la mayoría de los casos (**Fernández-Baca et al., 1970b**). Las causas involucran al gameto femenino (ovocito) como masculino (espermatozoide), al aparato reproductor femenino y al embrión en desarrollo. La receptividad sexual mostrada por las hembras no siempre indica, al momento de la cópula, que el ovocito presente sea óptimo para la ovulación y fertilización, y el cual presente un desarrollo embrionario normal (**Bravo et al., 1991**). Asimismo, existe una disminución en el número de especímenes de la raza Suri que posee la mejor calidad de fibra (lacia, sedosa, lustrosa y brillante) en comparación al de la raza Huacaya (opaca, rizada y esponjosa) debido a que es un fenotipo poco adaptativo a las alturas superiores a 4000 msnm (**Fernández-Baca et al., 1995**).

A nivel mundial, en la industria textil es cotizada por lo fino y suave de su fibra, por la variabilidad del diámetro de la misma que mide entre 18 a 33 micrómetros, la resistencia de su fibra a los procesos textiles y la diversidad de colores, más de 16 colores naturales, en gamas del blanco al negro y todos los matices del marrón, lo cual conlleva el gran interés en la comercialización de esta especie. Estas características que ofrece su fibra en comparación a otros camélidos sudamericanos, hace que esta especie sea un recurso importante ya que nuestro país presenta el mayor número de

especímenes. Existen otros países que presentan esta especie como Bolivia, Chile y Argentina, estos dos últimos en menor número, y otros países como Australia, Nueva Zelanda y Canadá que están comprando estos camélidos para su mejoramiento genético con avances tecnológicos que superan a los nuestros.

Debido a que esta especie tiene un elevado interés comercial esta investigación tiene como objetivo emplear los ovocitos de hembras provenientes de alpacas del camal para madurarlos y fertilizarlos mediante cultivo *in vitro*, lo cual podría contribuir en la mejora genética de esta especie. El cultivo *in vitro* de estas células, podría facilitar el manejo reproductivo por la selección de ovocitos de esta especie de importancia económica, contribuyendo en la mejora del acervo genético de esta especie.

ANTECEDENTES

El origen de los camélidos se remonta entre 9 a 11 millones de años en el oeste de Norteamérica, los cuales posteriormente se extinguieron durante las glaciaciones. Un grupo de sus descendientes migraron por el estrecho de Bering, al final de la Era Terciaria, hace tres millones de años hacia la antigua Eurasia dando origen a los camélidos que se conocen en el Asia Central y África, mientras que el otro grupo siguió migrando hacia Sudamérica hace 2 millones de años, en el Pleistoceno dando origen a los camélidos sudamericanos (**Wheeler, 1995**). La endocrinología reproductiva de los camélidos sudamericanos es comparativa a los camélidos del África y del Asia (**Sumar, 1996**).

Los camélidos son rumiantes y mamíferos pertenecientes al orden, **Artiodactyla**, del griego ἄρτιος (*ártios*), "par" y δάκτυλος (*dáktylos*), "dedo" que son mamíferos ungulados cuyas extremidades terminan en un número par de dedos los cuales se apoyan en el suelo por lo menos dos; los dedos más desarrollados son el tercero y el cuarto. Los camélidos difieren de otros artiodáctilos por la posesión de las uñas cubiertas únicamente por almohadillas en los pies en lugar de cascos. Esta característica los coloca en el suborden, **Tylopoda**. Otras diferencias incluyen la ausencia de cuernos o astas, una división labio superior y cuello largo curvo. A diferencia de los caballos y ganados, hay una falta del músculo tensor entre el muslo y el cuerpo para que las piernas de los camélidos parezcan ser muy largas. Los camélidos también no tienen vesícula biliar y son los únicos entre los mamíferos que tienen corpúsculos sanguíneos elípticos (**Schalm, 1967**).

La familia Camelidae se compone de dos géneros. Los del Viejo Mundo pertenecen al Género *Camelus* que incluye al *Arabia Camelus* “Dromedario” y al *Bactrian camelus* “Camello”. Los del Nuevo Mundo que son del Género *Lama* que comprenden las especies domesticadas *Lama pacos* “Alpaca” o *Lama glama* “Llama”, así como dos especies silvestres *Lama vicugna* “Vicuña” y *Lama guanicoe* “Guanaco”. Sin embargo, el análisis molecular basado en la secuencia del ADN mitocondrial (**Stanley et al., 1994**) mencionó que existió una divergencia de por lo menos 2 millones de años entre la vicuña y el guanaco, y por lo tanto sugiere que la vicuña es un género separado, clasificado como *Vicugna vicugna*. Según **Wheeler, 1995** los camélidos domésticos alpaca y llama desarrollaron a partir de los tipos silvestres vicuña y guanaco, respectivamente. Además se comprobó que estas cuatro especies poseen 37 pares de cromosomas (**Taylor et al., 1968**).

No se sabe exactamente cuándo las alpacas y llamas fueron domesticadas pero los restos óseos encontrados en los centros arqueológicos andinos sugieren que esto se produjo para ambas especies aproximadamente hace 6000 años (**Wheeler, 1995**). Existen evidencias de crianza de llamas y alpacas en las zonas costeras en el norte y el sur de Perú, respectivamente, de hace 900 a 1400 años y que los Incas ya criaban estos animales por su lana al momento de la conquista española. Los Incas utilizaban principalmente llamas como animales de carga, pero también los utilizaban por su lana y piel, y su estiércol para el combustible y fertilizante. Su capacidad para adaptarse a la altura y así sobrevivir en pastos pobres hizo de este animal un valioso recurso para ellos. Por otra parte, las alpacas

se utilizaban principalmente por la calidad de su fibra y ambas especies también fueron utilizadas por su carne. Se cree que el apareamiento entre llamas y alpacas desde la conquista española ha desempeñado un rol importante en el detrimento de la finura de la lana en comparación con las alpacas de la preconquista. Las muestras de fibra fina y fibra extra fina, obtenidas a partir de alpacas de la preconquista de hace 1000 años encontradas en momias reportó un diámetro promedio de fibra de $23,6 \pm 1,9$ μm y $17,9 \pm 1,0$ μm , respectivamente (**Wheeler, 1995**). En Australia, se estima que el 80% de las alpacas tienen diámetros promedio de fibra entre 25 y 30 μm . Sin embargo, a través de la selección en los últimos pocos años, la industria australiana de alpaca ha logrado un promedio inferior a 20 μm del diámetro de fibra en algunos de estos animales (**Brown, 2000**).

Las alpacas y llamas se encuentran principalmente en Perú y Bolivia, donde nuestro país presenta el 87% de la población alpaquera a nivel mundial. Vicuñas y guanacos se encuentran principalmente en Argentina (**Fernández-Baca, 1995**). Chile y Ecuador tienen pequeñas cantidades de las cuatro especies. Los camélidos sudamericanos en la actualidad mayoritariamente habitan a grandes altitudes de la cordillera de los Andes. La distribución geográfica de las alpacas abarca la Puna húmeda de 4 países sudamericanos (Perú, Bolivia, Chile y Argentina), donde nuestro país presenta el mayor número de especímenes. Su hábitat oscila entre los 3500 a 5000 metros sobre el nivel del mar.

La alpaca vive en grupos y pesa entre 60 y 70 kilogramos y su altura es de 1 metro, superando ligeramente a la vicuña, su ancestro. La estatura de la alpaca es considerablemente menor a la llama, compartiendo con esta y con el camello el hábito de escupir, utilizado para mostrar agresividad y como método de defensa. La alpaca presenta dos razas: Huacaya y Suri, las que se diferencian por su fibra. La fibra de la raza Huacaya es opaca, rizada y esponjosa, parecida a la lana de oveja, mientras que la fibra de la raza Suri es lacia, sedosa, lustrosa y brillante haciéndola de mejor calidad; encontrándose en estos últimos años una reducción considerable en esta última raza **(Fernández-Baca, 1995)**. Evidentemente, la raza Suri es un fenotipo no adaptativo a las altitudes superiores a 4000 metros sobre el nivel del mar como si es el fenotipo Huacaya, por lo que la raza Suri muestra una disminución de la eficiencia reproductiva y con ello una mayor mortalidad de los recién nacidos en comparación con la raza Huacaya **(Fernández-Baca, 1995)**. La reducción de la función reproductora puede reflejarse por la marcada disminución del número de ejemplares Suri en el Perú en los últimos 30 años, desde alrededor del 22% a menos del 5% del total de la población de alpacas. Actualmente, países de Europa y otros como Australia, Nueva Zelanda y Canadá han comprado individuos de esta especie en busca de mejorar genéticamente la fibra **(Brown, 2000)**. El número actual de alpacas en Australia se estima en 20000, lo que produce alrededor de 40 toneladas de lana al año **(Davison, 1998)**.

Hay informes contradictorios sobre la época de reproducción de alpacas y llamas; la cual parece variar en función del medio ambiente y al

sistema de manejo en que se mantienen. En su hábitat natural, en las tierras altas de América del Sur, la época de reproducción de las cuatro especies de camélidos parece ser estacional y se limita a los meses más cálidos y lluviosos de noviembre a abril, cuando existe un amplio forraje (**San Martín et al., 1968; Sumar, 1985**). La precipitación anual en las zonas de gran altitud varía entre 250 y 500 mm y se produce principalmente a partir de diciembre hasta abril de (**Sumar, 1996; San Martín et al., 1968**). En los rebaños del Perú donde el sistema de manejo permite a machos y hembras estar juntos todo el año, la reproducción se produce a partir de diciembre a marzo. En el caso que machos y hembras se mantengan separados, la reproducción está programada para llevarse a cabo durante los meses de enero a marzo, a fin de que el parto se produzca en el momento más favorable del año entre enero y abril (**Fernández-Baca, 1993**).

La continua presencia de los machos con las hembras puede tener un efecto inhibitorio en la orientación de la actividad sexual de los machos y, de hecho, puede causar que su libido desaparezca por completo (**Sumar, 1985, 1996**). A pesar de ello, la actividad sexual en estos machos se reanuda casi de inmediato si se van a introducir a un nuevo rebaño de hembras. Cuando machos y hembras se mantienen por separado y pueden copular ocasionalmente, por ejemplo, una vez al mes, ambos son sexualmente activos durante todo el año (**Sumar, 1985**) y las hembras pueden tener partos en cualquier época del año (**San Martín et al., 1968**), donde la reproducción parece tener poco o ningún efecto sobre la tasa de ovulación, la fertilización y la tasa de supervivencia de embriones (**Fernández-Baca et al., 1993**).

Durante la temporada de reproducción y en ausencia de los machos, las hembras permanecen en períodos de receptividad hasta 36 días, con sólo períodos ocasionales de duración del anestro (ausencia de la manifestación del celo) aproximadamente de 48 horas (**San Martín et al., 1968**). El control de los factores para el inicio de la actividad sexual en virtud de las condiciones de la reproducción natural, o el efecto inhibitor de la libido masculina como resultado de la exposición continua a las hembras, no se conocen. Sin embargo, además del sistema de manejo y efectos nutricionales, los factores ambientales como la temperatura, la humedad y la luz, así como las señales visuales u olfativas, pueden influir en los centros de control de la conducta reproductiva del sistema nervioso central (**Brown, 2000**). Estudios en Nueva Zelanda reflejó una mayor receptividad de las hembras en otoño a diferencia que en la primavera, de igual manera el manejo reproductivo mostró ser exitoso al utilizar hembras de 10 a 11 meses con machos de 2 años de edad (**Pollard et al, 1995**).

La mayoría de las hembras son sexualmente receptivas a los 12 y 14 meses de edad, a pesar que la actividad del ovario comienza a los primeros 10 meses, con el crecimiento de los folículos ováricos de 5 mm de diámetro o mayor que estos (**Novoa et al., 1970**). Aunque la aparición de la pubertad se ve afectada por las condiciones ambientales, es también muy influenciada por el estado nutricional. Aparentemente el logro del 60% del peso corporal de los adultos o cerca de 33 kg, es necesario para la aparición de la pubertad por lo que bajo las condiciones de una buena nutrición, un peso corporal de 33 kg es alcanzable al año (**Sumar, 1985; Smith et al., 1994**). Además, parece

existir una relación entre el peso corporal en el apareamiento y la tasa de natalidad. Por cada kg de ganancia en el cuerpo peso, se encontró el 5% de aumento en la tasa de preñez, pero por encima de 33 kg la tasa de preñez fue independiente del peso corporal **(Leyva y Sumar, 1981)**. Sin embargo, en los pastorales más pobres de nuestro país, las alpacas no maduran tan rápido y, en general, no son apareados hasta los 2 años de edad **(Brown, 2000)**.

En alpacas, los folículos ováricos entre 5 y 12 mm de diámetro se consideran normales y los folículos que son más grandes se consideran patológicos **(Sumar, 1985)**. La Foliculogénesis se completa alrededor de los 10 meses de edad pero las hembras jóvenes generalmente no son receptivas hasta los 12 a 14 meses de edad. El útero de alpacas y llamas es bicórneo con los dos cuernos uterinos separados por un tabique **(Brown, 2000)**. A diferencia de la mayoría de las especies domésticas, las camélidas hembras presentan ovulación inducida **(San Martín et al., 1968)**. La ovulación es inducida por la penetración del pene en la vagina y el cuello del útero, y no del simple montaje **(Fernández-Baca et al., 1970a)**, ya que el plasma seminal posee el factor inductor de maduración que incrementa los niveles de la hormona luteinizante **(Paolicchi et al., 1999; Adams et al., 2005; Ratto et al., 2005a)** que activa al factor promotor de la maduración. No obstante, la monta no asegura que ese ovocito llegue a ovular y ser fecundado, ya que cuando ocurre la monta no necesariamente el ovocito se encuentra en estado competente para la ovulación **(Gigli et al., 2006)**. Asimismo, la ovulación no está relacionada con la duración de la cópula, que puede tomar de 10 a 50

min. Las estimaciones de tiempo de la ovulación después de la cópula fueron del rango de 26 a 42 horas (**San Martín et al., 1968**). Generalmente, sólo se elimina un ovocito en cada ovulación, mientras que las ovulaciones múltiples se informaron producirse en el 10% de las hembras después del apareamiento natural. Que la ocurrencia de ovulación tras la cópula es influenciada por el tamaño de los folículos ováricos puede explicar por qué hasta el 20% de las hembras no ovulan después de únicas o múltiples cópulas con machos vasectomizados (**Brown, 2000**).

Bravo et al., 1991 encontró en alpacas y llamas que la ovulación no se produce en folículos ováricos menores de 7 mm de diámetro al momento de la cópula. La ovulación no se produce cuando los folículos son mayores o iguales a 7 mm de diámetro cuando éstos se encuentran en regresión al momento de la cópula (**Bravo et al., 1991**). En estos casos, los folículos luteinizados sobrevivieron durante 5 días y retrasó de 5 a 7 días el desarrollo de un nuevo folículo dominante (**Bravo et al., 1991**). Aparentemente las diferencias en la duración de la función lútea parece que se refieren a la variación del intervalo de tiempo entre la cópula y la ovulación. En consecuencia, si contamos el día 0 como el día de ovulación se encuentra un cuerpo lúteo detectable por laparotomía o ultrasonografía el día 3 y que alcanza el máximo tamaño los días 8 a 10. La reducción significativa del diámetro del cuerpo lúteo y de las concentraciones plasmáticas de progesterona es evidente en llamas y alpacas alrededor del día 10 y 12, respectivamente. La regresión completa del cuerpo lúteo se produce por el día 18 en ambas especies. Esta actividad lútea, ejerce un efecto supresor

sobre el crecimiento folicular y las hembras en general no son receptivas a los machos hasta que se reanude el crecimiento folicular **(Bravo et al., 1991)**.

La dinámica folicular, en camélidos, se debe al patrón de onda folicular que consta de tres etapas: el crecimiento, la maduración, incluido el período de dominación, y la regresión o atresia folicular. El desarrollo folicular de un ovario comienza a finales de la maduración o durante la primera fase de atresia de los folículos del otro ovario. Evidentemente, los folículos deben alcanzar un diámetro de alrededor de 4 a 6 mm antes de que la hembra sea receptiva al macho **(Bravo et al., 1991)**. En general, dos o tres folículos son reclutados para desarrollar durante la fase inicial de crecimiento, pero sólo uno y en algunos casos dos (en el 10% de estos animales) llegan al tamaño ovulatorio descrito en ser más de 7 mm de diámetro **(Adams et al., 1989; Bravo et al., 1990a)**. El folículo dominante suprime el desarrollo folicular de todos los demás folículos en ambos ovarios durante el tiempo que mantiene su tamaño de madurez, lo que se estima en unos 5 días **(Bravo et al., 1990a)**. Esta supresión del desarrollo folicular se debe a la inhibición neuronal de los centros que participan en la secreción de gonadotrofinas a raíz de la producción local de andrógenos e inhibinas ováricas. Si el apareamiento no se produce, el folículo dominante regresa dentro de 3 a 5 días y una nueva cantidad de folículos comenzará su fase de rápido crecimiento al día de atresia. Un nuevo folículo dominante puede convertirse dentro de 2 a 3 días **(Bravo et al., 1990a)**.

El folículo es la unidad estructural y funcional de los ovarios. La foliculogénesis se define como el proceso de formación, crecimiento y diferenciación folicular, que abarca desde el estadio de folículo primordial hasta el folículo preovulatorio, existiendo particularidades en cada especie. Mientras que la ovogénesis es el proceso de formación y desarrollo del ovocito que comienza con las ovogonias, que derivan de las células germinales primordiales en el embrión y culmina con la formación del ovocito II (ovocito en metafase II durante la meiosis II). Las células germinales primordiales se diferencian del epitelio del saco vitelino durante el desarrollo embrionario, migran a través del mesenterio y colonizan las gónadas primitivas del mesonefro y se conectan unas a otras por uniones intercelulares y finalmente se diferencian en ovogonias. Las ovogonias se dividen por mitosis antes de comenzar la meiosis. El número de divisiones mitóticas que ocurre durante el desarrollo embrionario es especie-específico. Las ovogonias se diferencian en ovocitos cuando comienzan la meiosis (**Gigli et al., 2006**)

Durante la foliculogénesis, las células pre-granulosas, derivadas del epitelio ovárico, se diferencian en células granulosas, rodeando a los ovocitos I (ovocito que se encuentra en meiosis I) quedando así formados los **folículos primordiales**. Estos se caracterizan histológicamente por el ovocito I detenido en la profase de su primer división meiótica (diploteno) que está rodeado por una capa plana de células de la granulosa. Estos folículos forman la reserva gametogénica que una hembra utiliza en toda su edad

reproductiva y es a partir de esta población que se origina toda la población de folículos en crecimiento (**Gigli et al., 2006**).

Las células planas de la granulosa antes de comenzar a dividirse por mitosis se diferencian en una capa de células de forma cúbica que rodea al ovocito I, cuando esto sucede los folículos se clasifican en **folículos primarios**. En esta etapa, el ovocito comienza a rodearse de una capa celular amorfa de glicoproteínas denominada zona pelúcida y las células de la teca interna comienzan a rodear externamente a las células de la granulosa (**Gigli et al., 2006**).

Las células de la granulosa aumentan de tamaño y número, en consecuencia se denomina **folículo secundario** al ovocito I rodeado por varias capas de células de la granulosa. Las células tecales se diferencian en una capa externa y otra interna rodeando por fuera a las células de la granulosa. Hasta este estadio los folículos se clasifican en preantrales debido a que aún no se ha formado la cavidad antral (**Gigli et al., 2006**).

Los **folículos terciarios** o **folículos antrales** se caracterizan histológicamente con la presencia de la cavidad antral (donde se encuentra el líquido folicular) y por estar rodeados de varias capas cúbicas de células de la granulosa que comienzan a secretar el líquido folicular, que al acumularse produce un reordenamiento de las mismas en células del cúmulos. Además, la teca interna está constituida por tejido conectivo y la teca externa está formada por una capa de colágeno atravesada por capilares con

miofibroblastos diferenciados de los fibroblastos del estroma (**Gigli et al., 2006**). A nivel molecular estos folículos fueron descritos por **Schuetz, 1974**; **Lacker et al., 1987** por tener una mayor expresión de receptores para la hormona folículo estimulante (FSH) en las células de la granulosa. Las células de la teca expresan receptores para la hormona luteinizante (LH). Los folículos terciarios se clasifican en dominantes y subordinados. Los folículos dominantes, a diferencia de los subordinados, expresan en las células de la granulosa además de los receptores para FSH, receptores para LH. Este estadio corresponde a la presencia de los **complejos cúmulus-ovocito**.

Los **folículos cuaternarios, llamados preovulatorios o folículos de De Graaf**, en honor a quien fuese el primer científico en examinar ovarios humanos en 1672, tienen la capacidad de responder al estímulo de la LH produciendo cambios morfológicos y bioquímicos que finalizarán reiniciando la meiosis y desencadenando la ovulación (**Gigli et al., 2006**).

La maduración del ovocito se consigue cuando se observa la desintegración de la membrana nuclear y los cromosomas se encuentran en plano ecuatorial durante la metafase II y el ovocito presenta el primer cuerpo polar. Cuando se realiza la fertilización de este ovocito maduro, se reinicia la meiosis II y se forma el segundo cuerpo polar, observándose los dos pronúcleos en el citoplasma del óvulo y la formación de la primera división celular posterior (**Schuetz, 1974**). La división celular meiótica puede ser inducida por varias señales extracelulares que interactúan con sus receptores ubicados en la membrana plasmática. Estas señales son

transferidas al citoplasma, lugar donde es amplificada (**Schjeide et al., 1970; Eppig y Downs, 1984**). Aquí se encuentra involucrado el factor promotor de la maduración, el cual se encuentra presente en células mitóticas y meióticas, vinculado por el mecanismo de fosforilación, los iones calcio, el adenosin monofosfato cíclico (**Eckberg, 1988; Heikinheimo y Gibbons, 1998; Schmitt y Nebreda, 2002**).

La rápida tasa de sustitución de folículos dominantes que prevalecen por períodos relativamente largos de tiempo garantiza casi ininterrumpidamente los niveles de estrógenos facilitando la receptividad continua a los machos. De los pocos estudios sobre los cambios endocrinos durante la cópula (**Sumar et al., 1988; Bravo et al., 1990b**), dieron a conocer que la concentración de estradiol en este momento ya es elevado a niveles de 10 a 20 pg/ml equivalentes a los valores máximos producidos en asociación con el folículo en desarrollo. Por lo tanto, es posible que los episodios de liberación de estradiol sean suficientes para mantener una continua sensibilización neuronal de los centros de control del comportamiento sexual, siempre que los períodos entre los sucesivos picos no sean amplios, quizás 1 a 2 días. Por lo tanto, los breves períodos de anestro que se producen en hembras no preñadas podrían explicarse por la ocasional asincronía entre las sucesivas oleadas de crecimiento folicular. Después de la copulación, el elevado nivel de estradiol sigue siendo esencialmente sin cambios hasta las próximas 18 horas, como mínimo, y no disminuye notablemente hasta alrededor de 22 a 48 horas (**Bravo et al., 1990b**).

La liberación de la hormona luteinizante (LH) en llamas y alpacas es similar a la que se produce en otros animales de ovulación inducida y se inicia en respuesta a la estimulación copulatoria. Las concentraciones plasmáticas de LH aumentan notablemente dentro de los 15 minutos de inicio de la cópula, seguido por un incremento de LH preovulatorio que alcanza el máximo a las 2 horas (**Bravo et al., 1991**). Los niveles circulantes de esta hormona disminuyen luego de 5 a 6 horas de la cópula, para alcanzar los niveles basales a las 7 horas (**Bravo et al., 1990b**). Luego de 24 horas del apareamiento inicial no parece estimular aún más la liberación de LH (**Bravo et al., 1992**). La influencia del tamaño folicular sobre la ovulación podría estar relacionada con su capacidad de secretar suficiente estrógeno para sensibilizar al sistema hipotálamo-pituitaria para producir LH en respuesta a la cópula en cantidades suficientes para provocar la ovulación (**Bravo et al., 1991**).

Las alpacas presentan una elevada mortalidad embrionaria, aproximadamente del 50% durante los primeros 30 días de gestación, siendo crítico este primer mes durante la gestación de esta especie. (**Fernández-Baca et al., 1970b**). La incapacidad del cuerno uterino derecho para llevar la preñez a término es probablemente la mayor causa. Aunque ambos ovarios parecen contribuir por igual al número total de ovocitos. Pocos embriones que se producen y se implantan en el lado derecho pueden sobrevivir más allá de 30 días de gestación y no sobreviven después de 87 días (**Fernández-Baca et al., 1970b**). Esto se debe a que el cuerno uterino izquierdo tiene un efecto luteolítico local y sistémico, mientras que el efecto luteolítico del cuerno

uterino derecho solamente es local y por lo tanto sólo afecta al ovario derecho (**Fernández-Baca et al., 1979**). La regresión del cuerpo lúteo ocurre en los 10 a 11 días posiblemente por la acción de la prostaglandina F2 de acción α que declinó la concentración de progesterona (**Sumar et al., 1988**). En alpacas preñadas, los niveles de progesterona se incrementaron en los 10 a 14 días y se mantuvo con ligeros cambios durante la preñez hasta 72 horas antes del parto (**Raggi et al., 1999**). Otros factores que están implicados en la pérdida de embriones constituye la mala nutrición, deficiencias de hormonas y la endogamia (**Brown, 2000**), así como el traslado de los animales (**Knight et al., 1995**).

La aplicación de la Biotecnología Reproductiva en camélidos sudamericanos es poco desarrollada en comparación a lo realizado en otras especies domésticas como por ejemplo bovinos, caballo, oveja, cabra; existiendo poco avance del manejo reproductivo de los camélidos y esto es menor aún en condiciones *in vitro* (**Miragaya et al., 2006**).

En los machos, los programas de **inseminación artificial** encuentran su principal limitación en la falta de métodos confiables y de rutina para la colección del semen. Intentos anteriores de este procedimiento en alpacas resultó muy pobre en las tasas de preñez que van desde 2,4% a 38% (**Calderón et al., 1968; Fernández-Baca y Novoa, 1968**). Recientemente el desarrollo de nuevos métodos para la colección de espermatozoides en alpacas donde se indujo la ovulación con 750 UI de hCG administrada intramuscularmente inmediatamente después de la inseminación usando el

semen sin diluir se obtuvo una tasa de preñez del 69,2% (**Bravo et al., 1997**). Otros estudios, han utilizado diluyentes del semen para mejorar la tasa de preñez, uno de ellos es la dilución seminal en yema de huevo-glucosa-citrato lo cual produjo una tasa de preñez del 64.3% (**Bravo et al., 1999**). El estudio realizado con alpacas en Australia reveló que el tiempo óptimo de la cópula es de 6 a 8 días de la nueva onda folicular emergente, lo cual podría mejorar el uso de la inseminación artificial (**Vaughan et al., 2004**). Tiempo en el cual se encuentra el folículo dominante en 6 a 7 mm el cual es adecuado para ser fertilizado en alpacas (**Vaughan et al., 2003**). El uso de espermatozoides criopreservados ha sido estudiado mediante diferentes métodos de congelamiento y descongelamiento pero aún con bajas tasas de motilidad (**McEvoy et al., 1992; Huanca y Gauly, 2001**). Otro estudio de inseminación de 19 alpacas usando semen congelado y descongelado produjo el nacimiento de 5 crías (**Bravo et al., 2000ab**).

En las hembras, es donde la Biotecnología Reproductiva se viene aplicando a diferentes niveles, aunque se encuentran en desarrollo. **La inducción de la ovulación** en alpacas y llamas puede ser realizada con la administración de hormonas exógenas con actividad de la LH, como la gonadotropina coriónica humana hCG, o con las hormonas que desencadenan la liberación de LH, como la hormona liberadora de gonadotropinas, GnRH (**San Martín et al., 1968; Fernández-Baca et al., 1970a, Adam et al., 1989; Bravo et al., 1992**). La ovulación se produjo alrededor de 26 horas después de la inyección de hCG (**San Martín et al., 1968; Novoa et al., 1970**) y en 28 horas después de la GnRH (**Bourke et al.,**

1992b). La dosis de hCG utilizada depende de la vía de administración y, evidentemente, de la estación del año. Se ha demostrado que cuando el apareamiento fue acompañado por una inyección de 750 UI de hCG, el aumento de la tasa de ovulación se incrementó en un 10% y el momento de la ovulación se redujo en al menos 24 horas **(Bourke et al., 1992a).** Fue reportado que es práctica común de los criadores de alpacas administrar una dosis de hCG poco después del apareamiento, para aumentar la ovulación y la preñez **(Brown, 2000).** Existen estudios de mejora de supervivencia embrionaria en alpacas, a los cuales se administraron GnRH a los 4 días después de la ovulación **(Arainga et al., 2003)** para asegurar el efecto de la progesterona que inhibe la receptividad de las hembras luego de la primera monta.

La sincronización de la dinámica folicular y superestimulación ovárica es bastante difícil. Esto se debe en gran medida a la ausencia de que las fases lútea ocurran espontáneamente porque son de ovulación inducida, y a la presencia de un folículo dominante que prevalezca durante largos períodos de tiempo en las hembras no preñadas **(Brown, 2000).** En llamas, **Ferrer et al., 2002** refirieron que la administración de la progesterona endógena y exógena, como es el caso de la buserelina, detiene el crecimiento folicular y fue usado como sincronizador de la onda folicular. Asimismo, también se viene usando una fase lútea artificial elaborada ya por casas comerciales **(Bourke et al., 1995a; Aller, 2002b).**

La transferencia de embriones, la cual en alpacas trajo consigo el nacimiento de una cría viva, reportado por **Sumar y Franco en 1974**. Los procedimientos para la colección y transferencia no quirúrgica de embriones de llamas se han descrito en detalle (**Wilson y Chapman, 1985**). La ovulación en animales donantes y receptoras fue sincronizada con una variedad de medios, incluyendo el apareamiento, o el tratamiento con GnRH o hCG. La aparición de las ovulaciones fue controlada mediante ultrasonografía transrectal y los embriones se recogieron de 6 a 8 días después de la ovulación (**Bourke et al., 1995b**). Se informó que el 50% (5/10) de las hembras receptoras llegaron a embarazos a 344 días y uno a 304 días después de la transferencia. Todos los embarazos fueron implantados en el cuerno uterino izquierdo y ninguna de las hembras beneficiarias que recibieron dos embriones tuvo gemelos **Bourke et al., 1995b**). El uso de gonadotrofina coriónica de equina (eCG) y de hCG no sólo favoreció la superestimulación sino también la obtención de blastómeros de alpaca (**Novoa et al., 1999**).

La recuperación de ovocitos para la maduración *in vitro* se viene investigando en llamas obteniendo 62% de ovocitos en Metafase II (**Del Campo et al., 1992**). También se realizó la maduración de ovocitos *in vivo* e *in vitro* en Llama bajo inducción hormonal. La primera mediante la administración de LH después de FSH o gonadotrofina coriónica de equino (eCG), mientras que la maduración *in vitro* mediante FSH y estradiol (**Ratto et al., 1999**). La maduración *in vitro* de ovocitos de Alpaca fue llevada a cabo mediante estradiol luego de la inducción hormonal *in vivo* realizada con hCG

(gonadotrofina coriónica humana) después de FSH o eCG. **(Ratto et al., 2007).**

La fertilización *in vitro* (FIV) es bastante incipiente en los camélidos. **Del Campo et al., 1994** desarrolló la Fertilización *in vitro* con ovocitos de llama madurados *in vitro* y haciendo uso de espermatozoides del epidídimo. Se reportó la producción de embriones mediante fertilización *in vitro* en llamas con inducción ovárica previa **(Conde et al., 2008)**. Por otra parte, **Gomez et al., 2002**, reportó la primera producción de embriones híbridos (alpaca y llama) mediante la FIV heteróloga (entre gametos de diferentes especies). Posteriormente, en otro estudio se realizó la fertilización heteróloga a partir de los ovocitos maduros de alpaca y espermatozoides de llama **(Ratto et al., 2007)**.

La inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) técnica que usa una pequeña cantidad de espermatozoides a diferencia de la FIV fue llevada a cabo en llamas **(Conde et al., 2008)**. **La transferencia nuclear** produjo embriones de llama en el estadio de 8 células **(Sansinema et al., 2003)**. **La crioconservación de embriones** fue investigada exponiendo trofoblastos de llama a sustancias crioprotectoras evaluando la toxicidad en las células **(Palasz et al., 2000)**. Otros estudios fue realizados mediante la vitrificación y el congelamiento lento de embriones de llamas **(Lattanzi et al., 2002)** y por la vitrificación de embriones de llamas y vicuñas **(Aller, 2002ab)**

Teniendo en cuenta el manejo reproductivo en los camélidos, especialmente en alpacas, este estudio de investigación busca obtener ovocitos maduros de alpaca mediante el cultivo *in vitro* capaces de ser fertilizados *in vitro* de manera que puedan desarrollar cigotos potencialmente viables a fin emplearlo como una herramienta biotecnológica para un futuro mejoramiento reproductivo mediante la selección genética de esta especie de gran importancia económica.

MATERIALES Y MÉTODOS

❖ **Material Biológico**

Se colectaron 32 ovarios de hembras de *Vicugna pacos*, los cuales fueron adquiridos del Camal Municipal de la ciudad de Huancavelica (**Figura A**). Los ovarios fueron extraídos minutos después de haber sido sacrificados estos animales, y fueron colocados en un termo, a temperatura de 37 °C, para su traslado hacia el laboratorio. En este lugar, también fueron colectados los testículos para la extracción de los epidídimos, provenientes de machos de *Vicugna pacos*, los cuales también fueron extraídos minutos después de que eran sacrificados estos animales, y puestos en congelantes, a temperatura de 4 °C, para su traslado hacia el laboratorio en no más de 1 hora de colectados. a fin de conservar la viabilidad celular.

❖ **Aislamiento y selección de los ovocitos**

Una vez llegado al Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Universidad Nacional de Huancavelica, los ovarios colectados (**Figura B**) fueron colocados en suero fisiológico, previamente puesto en baño maría a 37 °C. Cada Complejo cúmulus-ovocito (COC) formado por el ovocito rodeado de células de granulosa, fue obtenido por aspiración folicular ovárica mediante una jeringa de 5ml unida a una aguja 21 G con el bisel colocado hacia arriba (**Figura C**) en forma cuidadosa y con la aguja lavada en suero

·
fisiológico. Posteriormente, los COC fueron transferidos a una placa petri
temperados en una coccinilla eléctrica a 37 °C para ser clasificados.

❖ **Categorización de los ovocitos**

Los COC antes del cultivo fueron categorizados en Grado 1: ovocito con citoplasma uniforme y con más de 4 capas de células de granulosa compactas; Grado 2: ovocito con citoplasma uniforme y con 2 ó 3 capas de células de granulosa compactas; Grado 3: ovocito con citoplasma irregular y con las capas de células de granulosa disgregadas, y Grado 4: ovocito con citoplasma irregular sin células de granulosa, en total degeneración. Dicha evaluación fue realizada bajo el estereomicroscopio y el microscopio invertido.

❖ **Diseño experimental**

Del total de COC obtenidos, no intervinieron en el cultivo los de Grado 4 (no viables). Para la maduración *in vitro*, se distribuyó al azar los COC categorizados para su cultivo ya sea en Medio TCM-199 suplementado (**Ratto et al., 2007**) o en IVF suplementado, donde el número de los COC cultivados fue por lo general en la proporción de 2:1, respectivamente, excepto el Cultivo1 (**Tabla 1**). Sólo los que llegaron a madurar fueron cultivados en Medio Fert-TALP (**Bavister y Yanagimachi, 1977**) para la Fertilización *in vitro* (**Figura 1**).

Tabla 1. Distribución de los COC para el cultivo en TCM-199 e IVF

	COC obtenidos	COC Grado 4 (no cultivados)	COC en Medio TCM-199	COC en Medio IVF
Cultivo 1	8	0	0	8 *
Cultivo 2	41	7	24	10
Cultivo 3	36	5	21	10
Cultivo 4	35	5	20	10
Cultivo 5	38	8	20	10
Total	158	25	85	48

* No pudieron ser fertilizados por no haber espermatozoides.

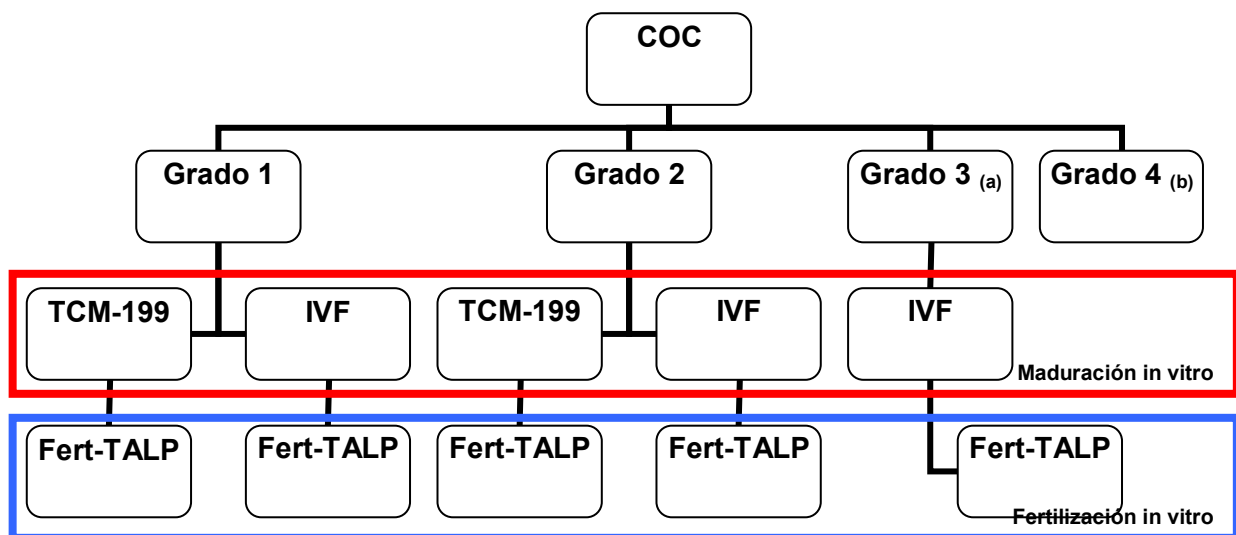


Figura 1. Diseño experimental de Maduración y Fertilización.

Sólo los ovocitos que lograron madurar continuaron el siguiente cultivo para la fertilización.

(a): Cultivados sólo en Medio IVF, (b): No entraron al cultivo.

❖ **Maduración de los ovocitos *in vitro***

Los ovocitos fueron colocados en grupos de 8 a 10 en gotas de 50 µl de Medio de Maduración: TCM-199 suplementado (**Ratto et al., 2007**) o IVF suplementado, previamente preparados y puestos en las placas de cultivo, las cuales fueron cubiertas con aceite mineral (Sigma M8410) e incubadas a 37 °C con 5% de CO₂ por lo menos cuatro horas antes del cultivo. La suplementación del TCM-199 fue con suero fetal de ternera (FCS) al 10%, hormona folículo estimulante (FSH) 0.02 UI/ml, piruvato de sodio (0.2 mM), gentamicina (50 µg/ml), 17 β-estradiol (1 µg/ml) (**Tabla A y B**). Mientras que el Medio IVF estuvo suplementado con hCG (10 UI/ml) y 17 β-estradiol (99 µg/ml) (**Tabla C y D**). El cultivo fue por 26 horas, tiempo que se prolongó hasta las 48 horas (una sola vez) cuando no había espermatozoides para completar la siguiente parte del cultivo. En este último caso, se realizó el cambio de medio de cultivo extrayendo 25 µl del Medio de Maduración antiguo y colocando 25 µl del medio Medio de Maduración fresco también suplementado.

❖ **Fertilización *in vitro***

Los epidídimos fueron separados de los testículos para luego ser colocados en una placa petri conteniendo Medio Sperm-Talp (**Tabla E**) suplementado con 3 mg/ml de Suero Albúmina Bovina (**Bavister y Yanagimachi, 1977**), puestos luego bajo un estereomicroscopio para que

mediante la perforación y trituración del tejido se puedan obtener los espermatozoides.

Para ser utilizados en la fertilización, dichos espermatozoides fueron recuperados por el método del Swim-up, para ello se centrifugó el tejido epididimario triturado en 2 ml de Medio Sperm-Talp, suplementado, durante 5 minutos a 1800 rpm, 2 veces. Se eliminó el sobrenadante y al precipitado se agregó 100 μ l de Medio Fert-TALP (**Bavister y Yanagimachi, 1977**) suplementado con 6 mg/ml de Suero Albúmina Bovina libre de ácidos grasos y 10 μ g/ml de heparina (**Ratto, et al, 2007**). Luego, se trasvasó a un tubo microcentrífuga con 1ml de Medio Fert-TALP suplementado para ser incubado de 45 minutos a 1 hora a 37 °C donde por migración ascendente se encontraron los espermatozoides.

Los ovocitos maduros fueron colocados en otra placa petri conteniendo gotas de 150 μ l de Medio Hepes-TALP (**Tabla F**) y de 100 μ l de Medio Fert-TALP suplementado (**Tabla G**). Para ello, los ovocitos maduros fueron trasladados hacia las gotas de Medio Hepes-TALP para ser lavados con ayuda de una micropipeta de 1 μ l, de igual manera se hizo el lavado en Medio Fert-TALP suplementado, para luego ser colocados en otra placa petri con gotas de 50 μ l de Fert-TALP suplementado, previamente cubiertas con aceite mineral. Los ovocitos maduros fueron colocados en no más de 10 por gota.

Transcurrido el tiempo de incubación de los espermatozoides, se extrajo 50 µl del sobrenadante y se colocó en la gota de 50 µl de Medio Fert-TALP suplementado donde están los ovocitos maduros para iniciar la Fertilización *in vitro*, incubándose a 37 °C con 5% de CO₂. Este cultivo fue de 48 horas a 72 horas.

❖ **Evaluación de los ovocitos**

Los ovocitos fueron evaluados antes y después de la maduración *in vitro* mediante la ausencia o presencia del primer cuerpo polar y la expansión de las células cúmulos de los COC, indicadores de madurez citoplasmática del ovocito (**Kruip et al., 1983**) haciendo uso del microscopio invertido con ayuda de una cámara digital. Asimismo, la fertilización *in vitro* de los ovocitos maduros se evaluó cuando se observó la división celular o segmentación del cigoto mediante el microscopio invertido con ayuda de una cámara digital.

❖ **Análisis estadístico**

Los resultados de los cultivos de los ovocitos para la maduración y fertilización *in vitro*, fueron evaluados mediante el software STATA versión 10 por el Test de Proporciones y el Test de Chi-cuadrado.

RESULTADOS

1. Aislamiento y selección de los ovocitos.

Mediante la aspiración folicular, 158 Complejos cúmulo-ovocito (COC = 100%) fueron extraídos de los diferentes ovarios de hembras de *Vicugna pacos*, de los cuales 25 COC (15.82%) eran de Grado 4 (**Figura 2**) por lo que ya no intervinieron en el cultivo durante la maduración *in vitro*.

Antes de la maduración *in vitro*, el resto de los COC (n = 133, 84.18% de recuperación) fueron categorizados en Grado1 (n = 68): Grado 2 (n = 61): y de Grado 3 (n = 4) (**Figuras 3, 4 y 5**).

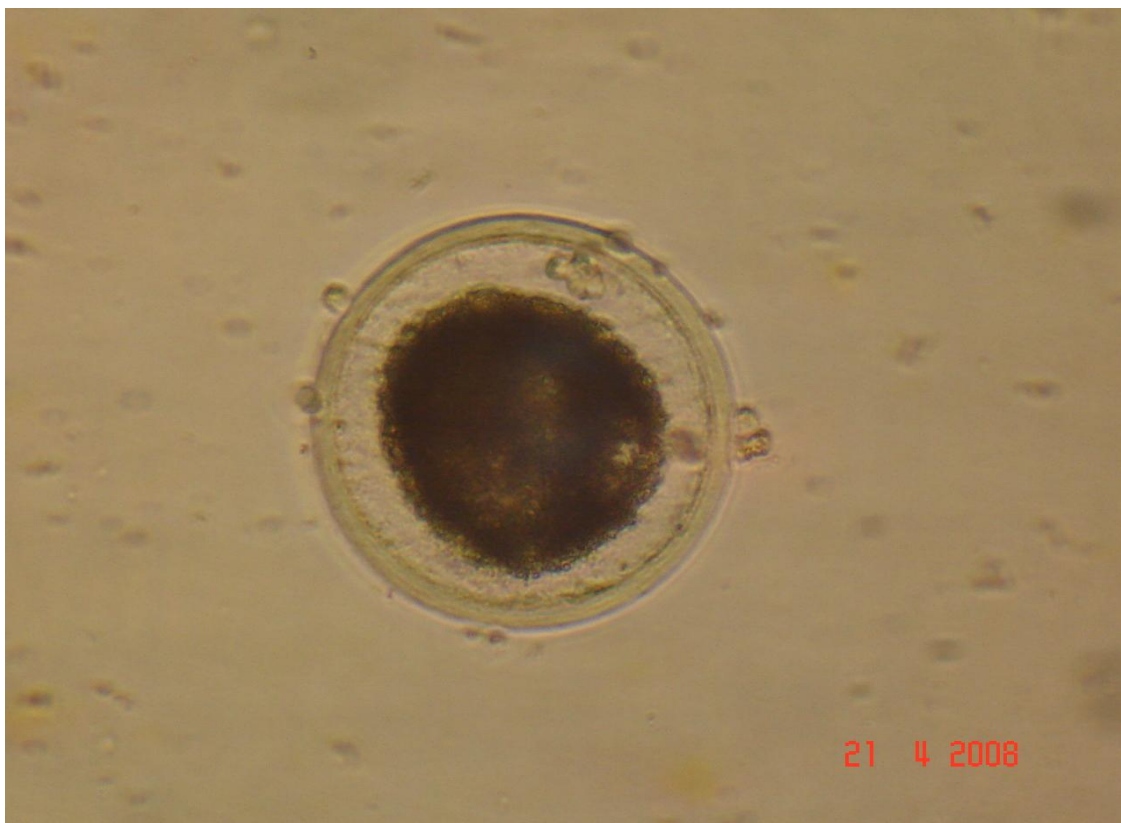


Figura 2. Complejo cúmulo-ovocito de Grado 4 cuyo ovocito presentó citoplasma irregular sin células de granulosa, en total degeneración.

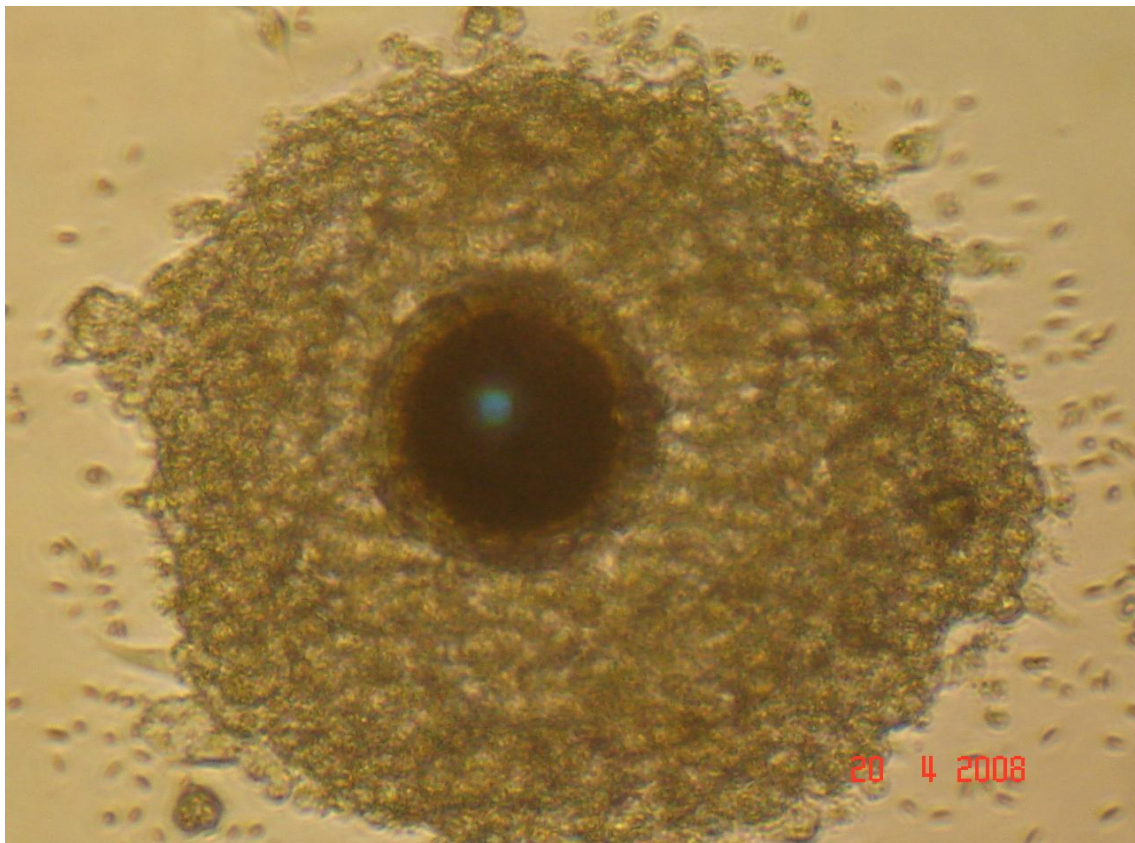


Figura 3. Complejo cúmulus-ovocito de Grado 1 cuyo ovocito presentó citoplasma uniforme y con más de 4 capas de células de granulosa compactas

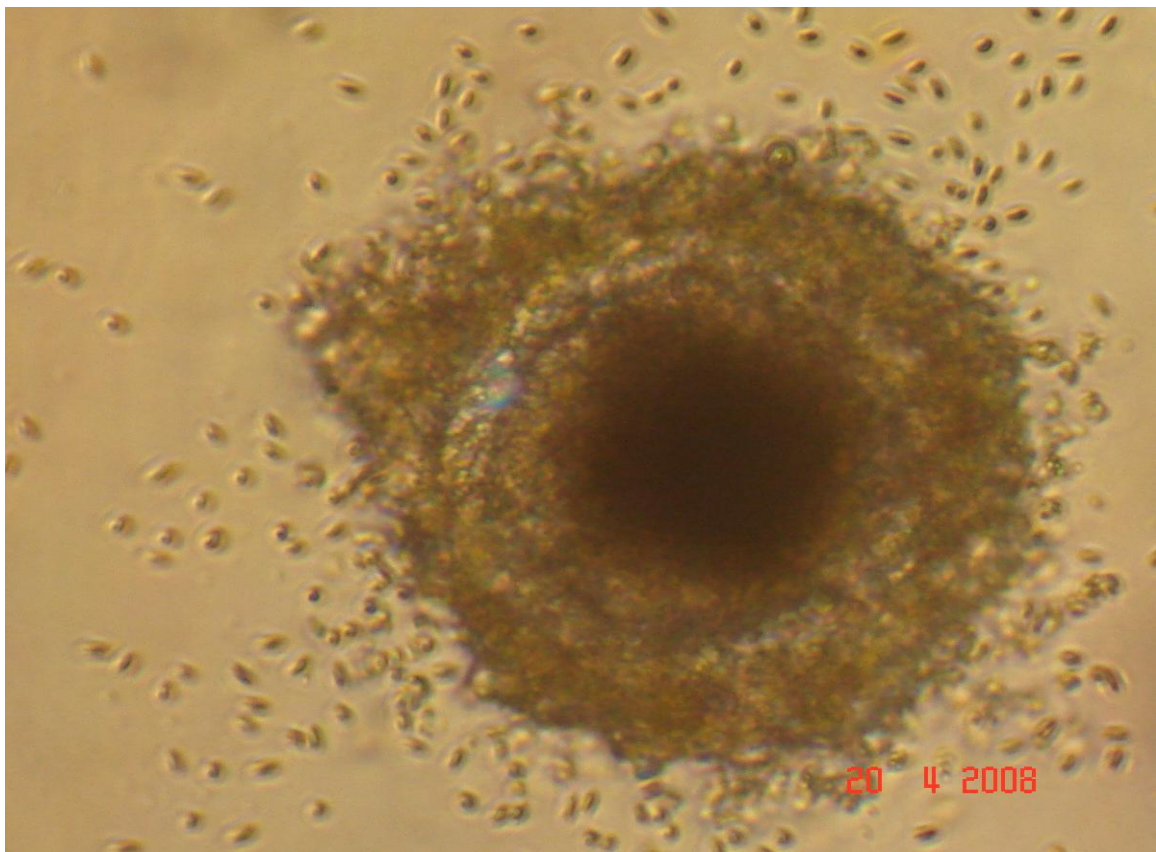


Figura 4. Complejo cúmulus-ovocito de Grado 2 cuyo ovocito presentó citoplasma uniforme y con 3 capas de células de granulosa compactas.

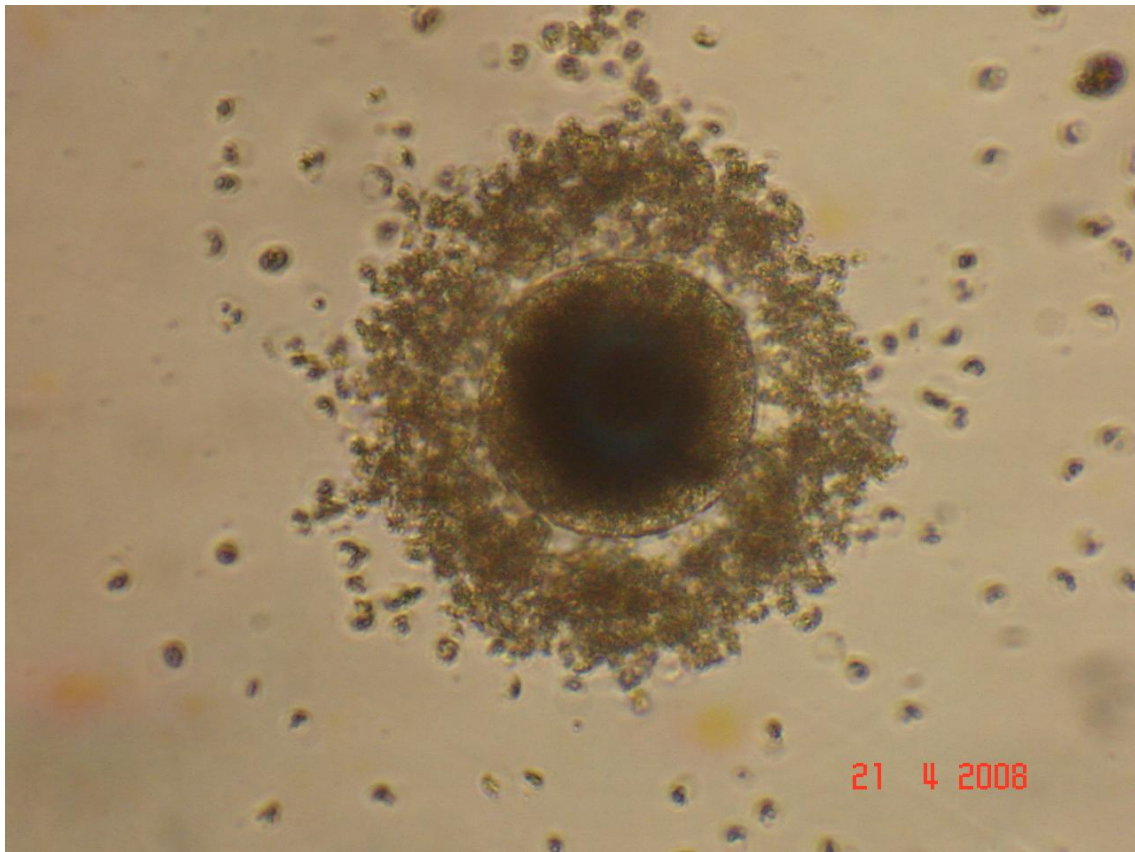


Figura 5. Complejo cúmulus-ovocito de Grado 3 cuyo ovocito presentó citoplasma irregular y con las capas de células de granulosa disgregadas

2. Maduración de los ovocitos *in vitro*

De los 133 COC puestos en cultivo para la maduración *in vitro* (**Figura 6**), 85 fueron cultivados en Medio TCM-199 suplementado: 43 COC de Grado 1 y 42 COC de Grado 2 (**Figura 7**). De los cuales 32/43 (74.42%) y 29/42 (69.05%) de los ovocitos llegaron a madurar, respectivamente, visualizado por la expansión de las células del cúmulus que se encuentran adyacentes al ovocito (**Figura 8**) y/o la expulsión del primer cuerpo polar (**Figura 9**), siendo ambos indicadores de maduración.

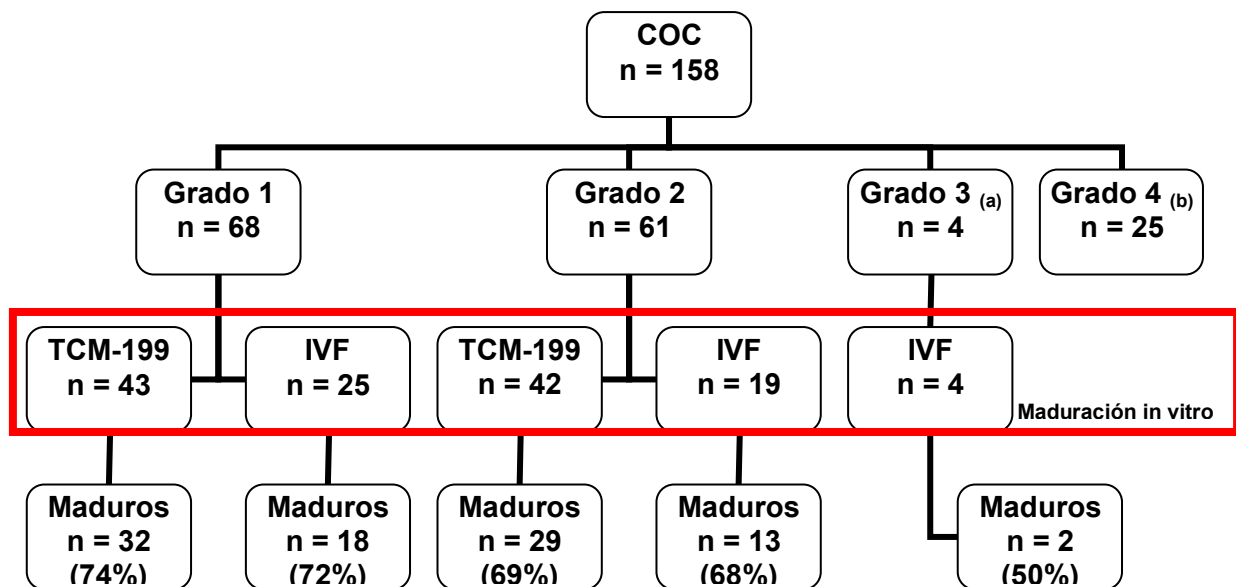


Figura 6. Maduración *in vitro*.

(a): COC cultivados sólo en Medio IVF, (b): No entraron al cultivo.

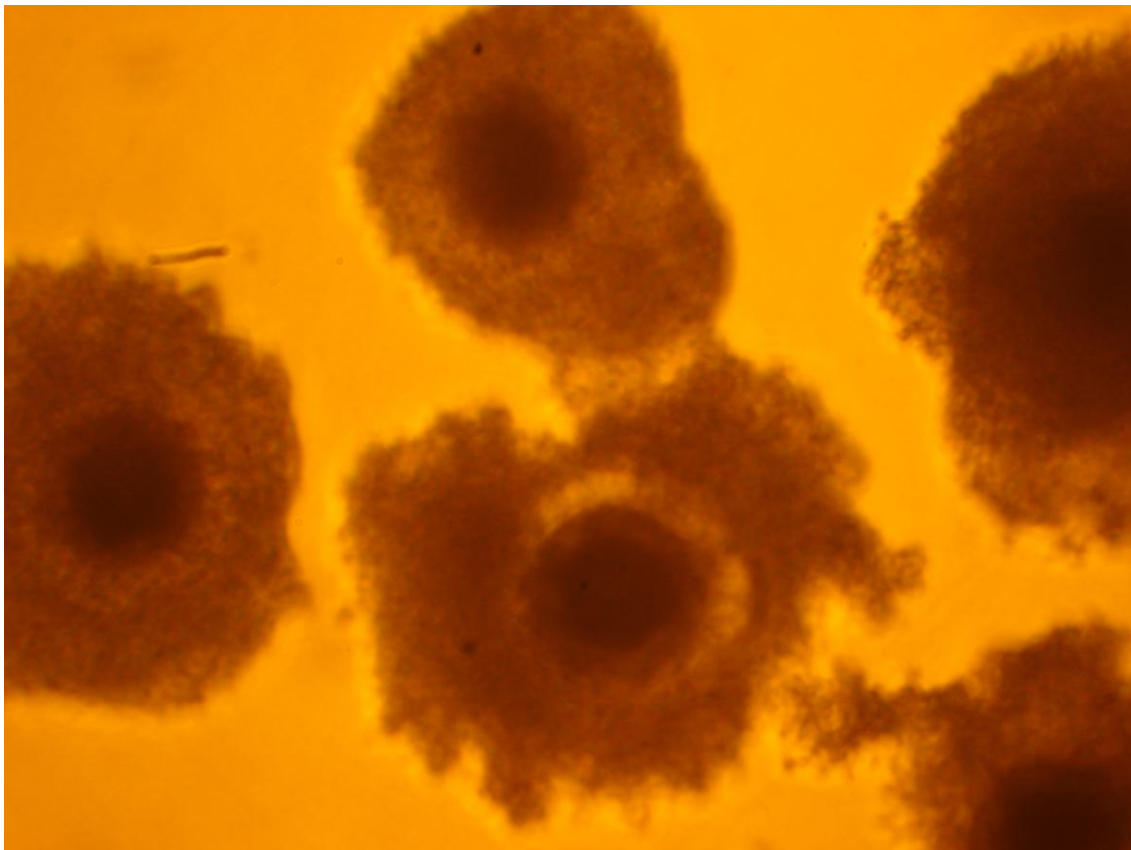


Figura 7. Complejos cúmulus-ovocito en Medio de Maduración TCM-199, a las 0 horas de cultivo.

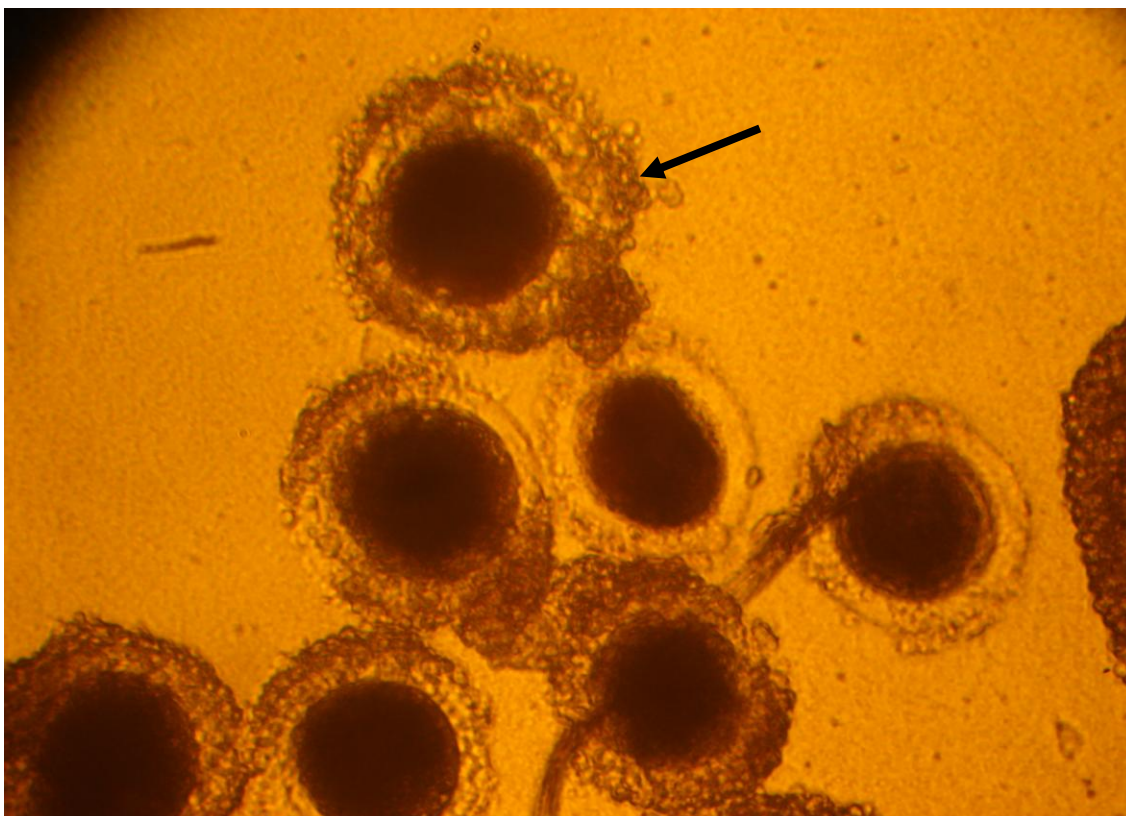


Figura 8. Ovocito con expansión de las células del cúmulus (flecha) a las 26 horas de cultivo en Medio de Maduración TCM-199.

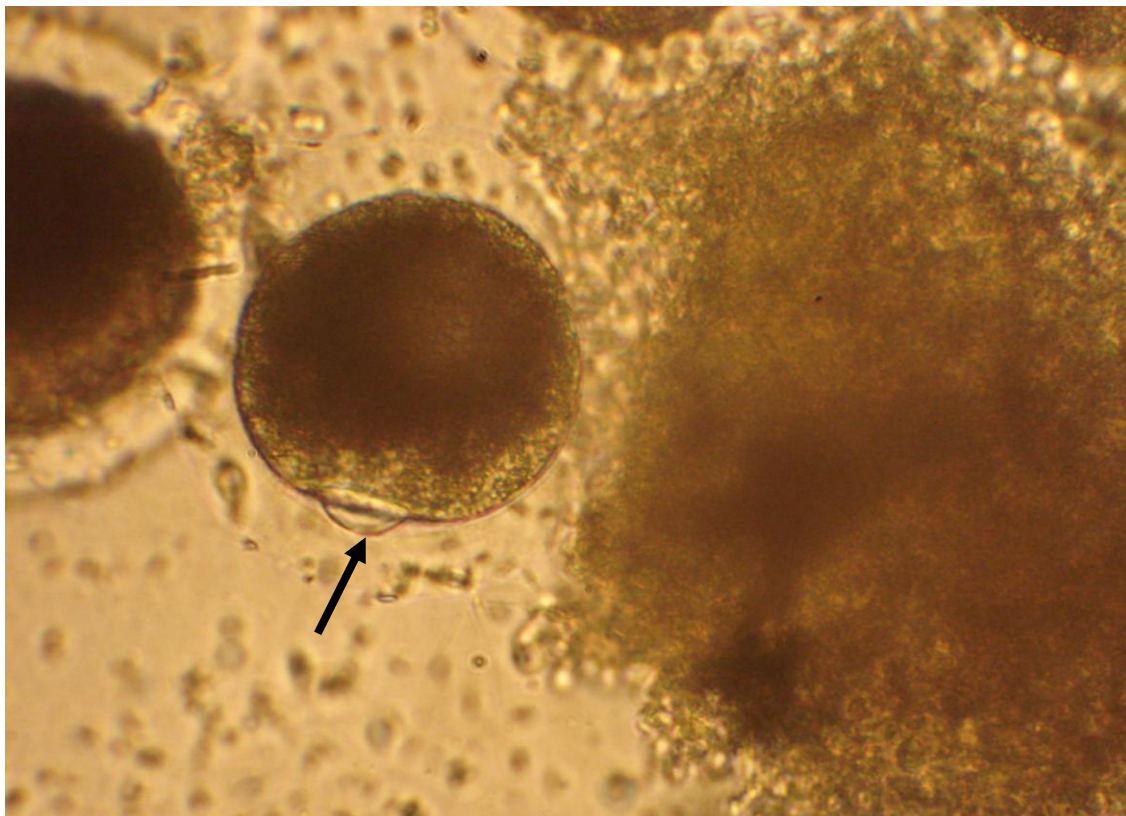


Figura 9. Presencia del cuerpo polar (flecha) de un ovocito a las 26 horas de cultivo en Medio de Maduración TCM-199.

Asimismo, 48 COC fueron cultivados en Medio IVF suplementado: 25 COC de Grado 1, 19 COC de Grado 2, y 4 COC de Grado 3 (**Figura 10**). De los cuales 18/25 (72%), 13/19 (68.42%) y 2/4 (50%) de los ovocitos llegaron a madurar, respectivamente, visualizado también por la expansión de las células del cúmulus que se encuentran adyacentes al ovocito (**Figura 11**) y/o la expulsión del primer cuerpo polar (**Figura 12**), siendo ambos indicadores de maduración.

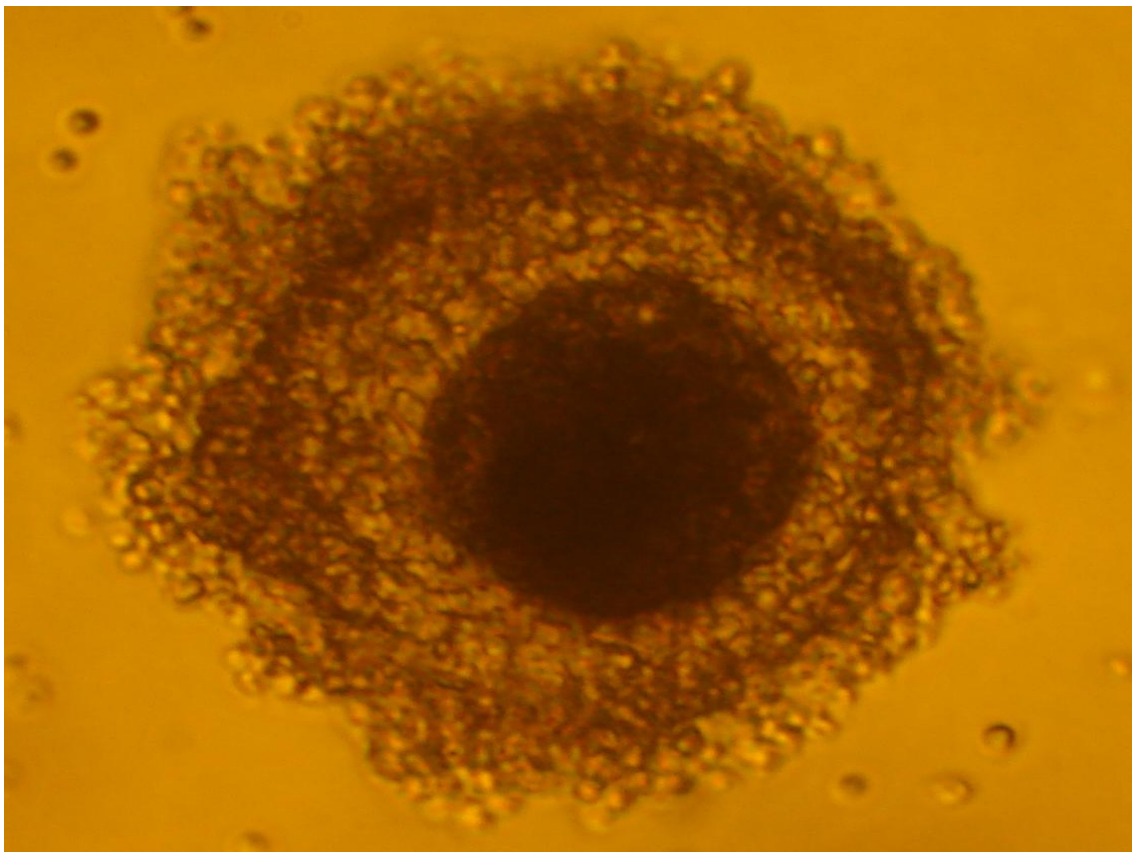


Figura 10. Complejos cúmulus-ovocito en Medio de Maduración IVF, a las 0 horas de cultivo.

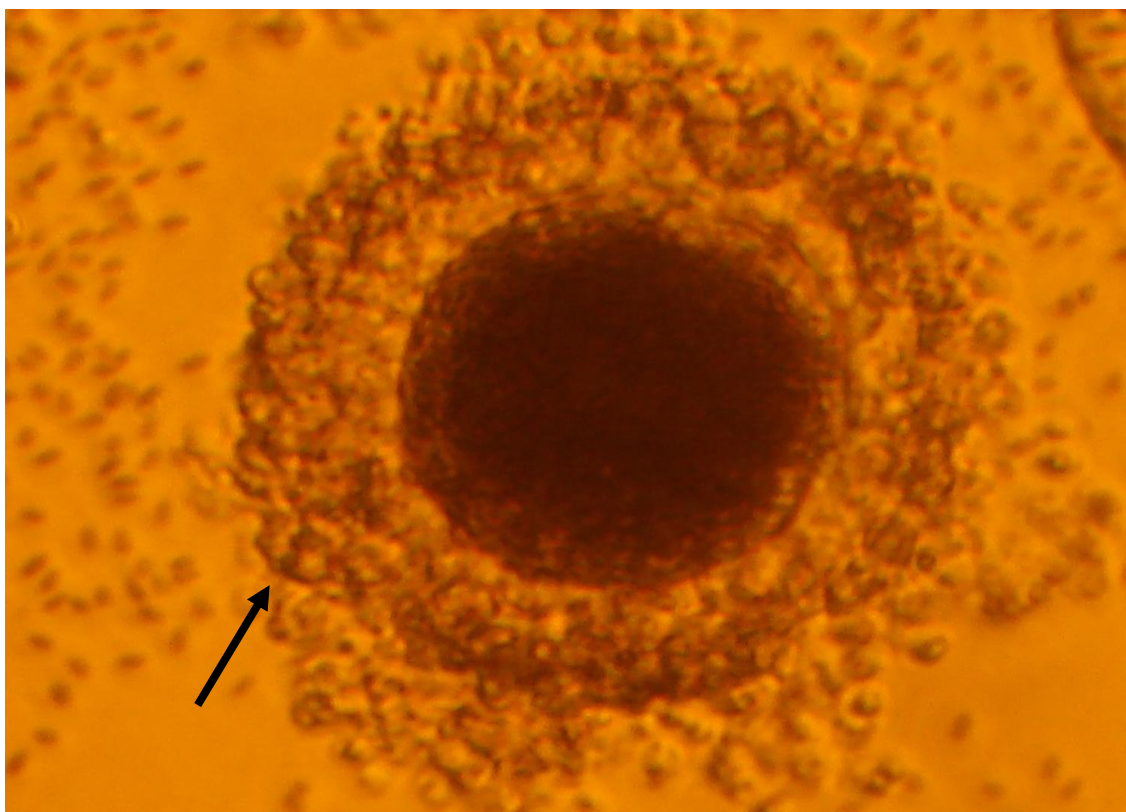


Figura 11. Ovocito con expansión de las células del cúmulus (flecha) a las 26 horas de cultivo en Medio de Maduración IVF.



Figura 12. Presencia del cuerpo polar (flecha) de un ovocito a las 26 horas de cultivo en Medio de Maduración IVF.

Mediante el Test Chi-cuadrado se detectó que no existió asociación entre el grado de los COC y la maduración ($p>0.05$, **Tabla 2**) por lo que se optó no contar con los 2 ovocitos madurados de grado 3, para el siguiente análisis estadístico. Mediante el Test de Proporciones se determinó que no existe diferencia significativa ($p>0.05$, **Tabla H**) entre el número de ovocitos madurados con el Medio TCM-199 suplementado ($61/85 = 71.76\%$) y con el Medio IVF suplementado ($31/44 = 70.45\%$). También esta prueba evidenció que tampoco había diferencia significativa ($p>0.05$) entre el número de ovocitos madurados provenientes de los COC de grados 1 y 2 tanto en aquellos cultivados con el Medio TCM-199 suplementado (**Tabla I**) como en los cultivados con el Medio IVF suplementado (**Tabla J**).

Tabla 2. Asociación entre el grado del COC y la maduración *in vitro* de ovocitos.

COC	Maduración citoplasmática del ovocito		Total
	No maduró	Maduró	
Grado 1	18	50	68
Grado 2	19	42	61
Grado 3	2	2	4
Total	39	94	133
Test Chi-cuadrado. Pr = 0.552			
No existe asociación ($p > 0.05$)			

3. Fertilización de los ovocitos *in vitro*

En la fertilización *in vitro* realizada con los ovocitos maduros (**Figura 13**), se encontró que 13 de los 61 ovocitos madurados en Medio TCM-199 suplementado (21.31%) presentaron segmentación del cigoto, caracterizado por una serie de divisiones mitóticas (**Figura 14**).

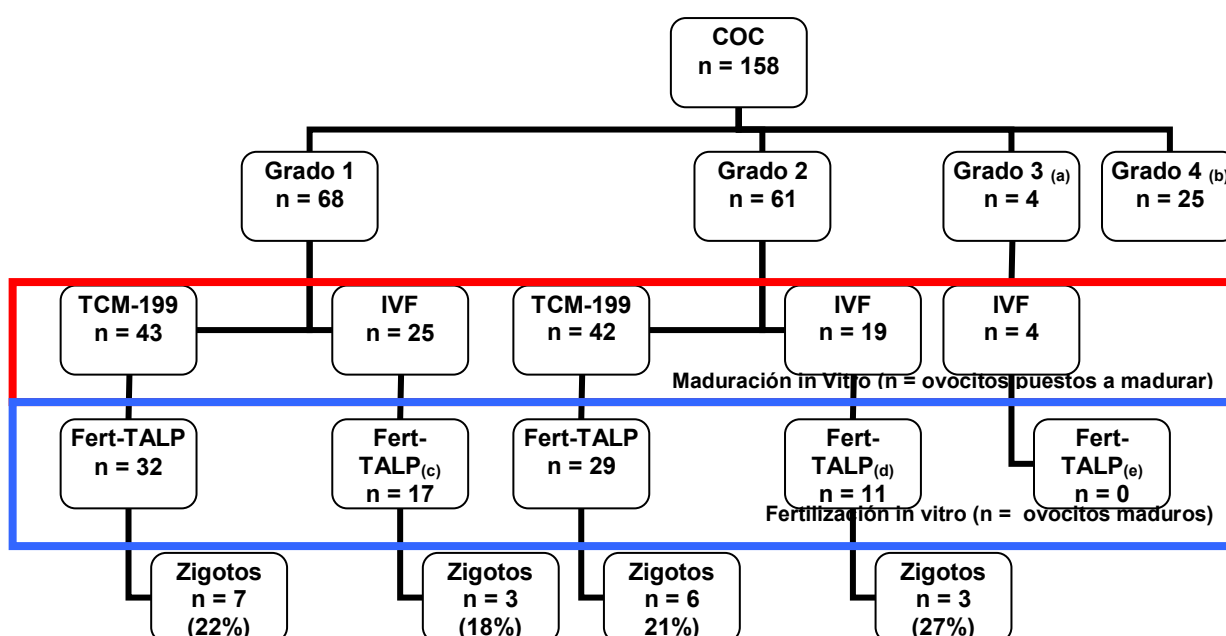


Figura 13. Fertilización *in vitro*. (a): Cultivados sólo en Medio IVF, (b): No entraron al cultivo, (c): Maduraron 18 pero 1 no pudo ser fertilizado por ausencia de espermatozoides, (d): Maduraron 13 pero 2 no pudieron ser fertilizados por ausencia de espermatozoides, (e): Maduraron 2 pero no pudieron ser fertilizados por ausencia de espermatozoides.

Mientras que para los 33 ovocitos de los casos estudio madurados en Medio IVF suplementado, sólo 28 fueron cultivados para ser fertilizados porque cuando se obtuvo esos 5 ovocitos maduros (1 de Grado 1, 2 de Grado 2, y 2 de Grado 3) no habían espermatozoides para la fertilización. Es decir que 6 de los 28 ovocitos madurados en Medio IVF suplementado (21.43%) presentaron división del ovocito fertilizado, y en otros casos llegaron a

segmentarse, caracterizado por una serie de divisiones mitóticas. La fertilización fue evaluada a partir de las 48 horas del cultivo (**Figura 15**) en Medio de cultivo Fert-TALP continuando hasta las 72 horas de incubación (**Figura 16**).

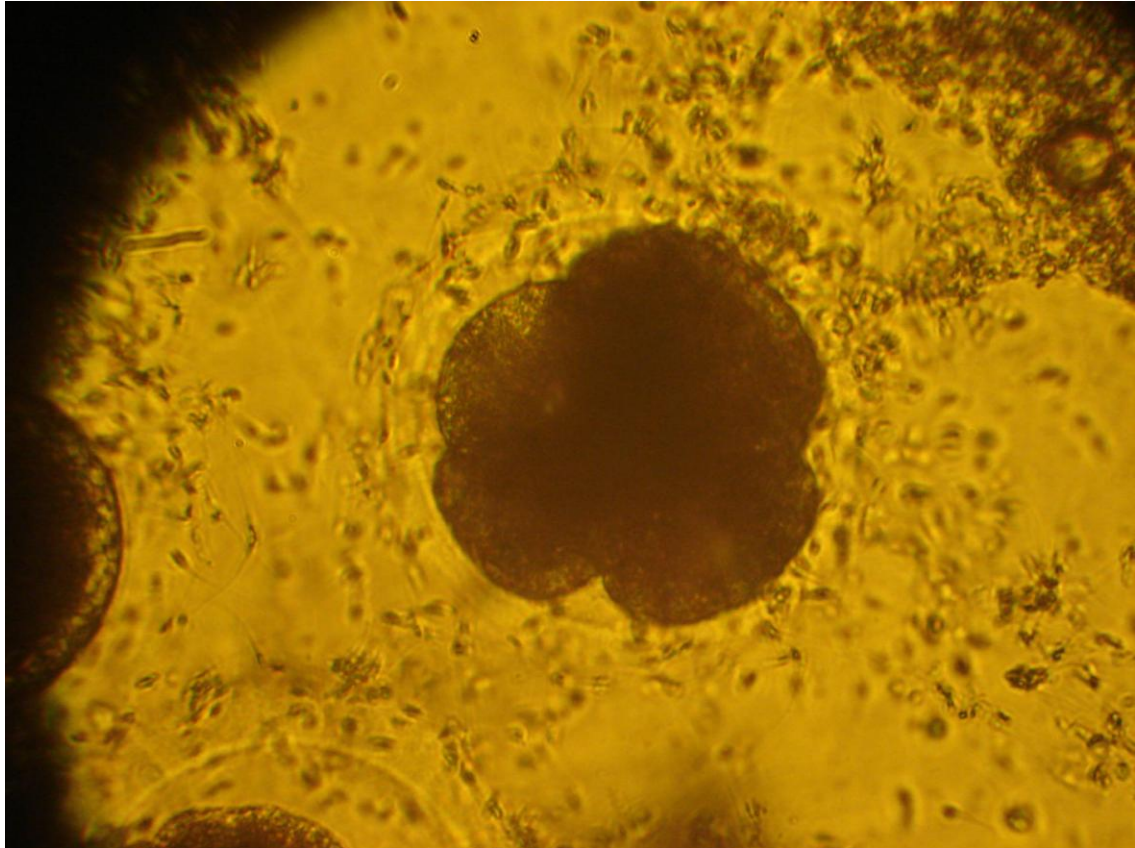


Figura 14. Segmentación del cigoto a los 72 horas obtenido en Medio Fert-Talp luego que el ovocito fue madurado en Medio TCM-199.

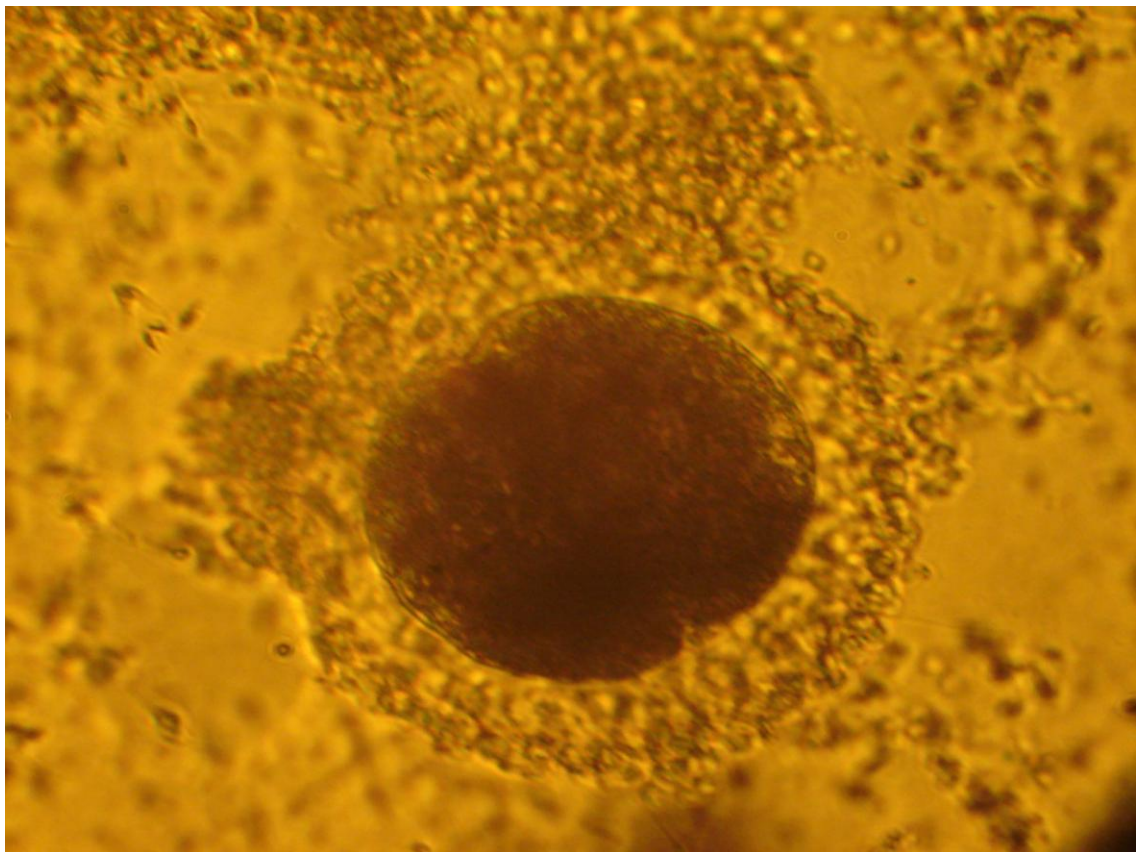


Figura 15. Segmentación del cigoto a los 48 horas obtenido en Medio Fert-Talp luego que el ovocito fue madurado en Medio IVF

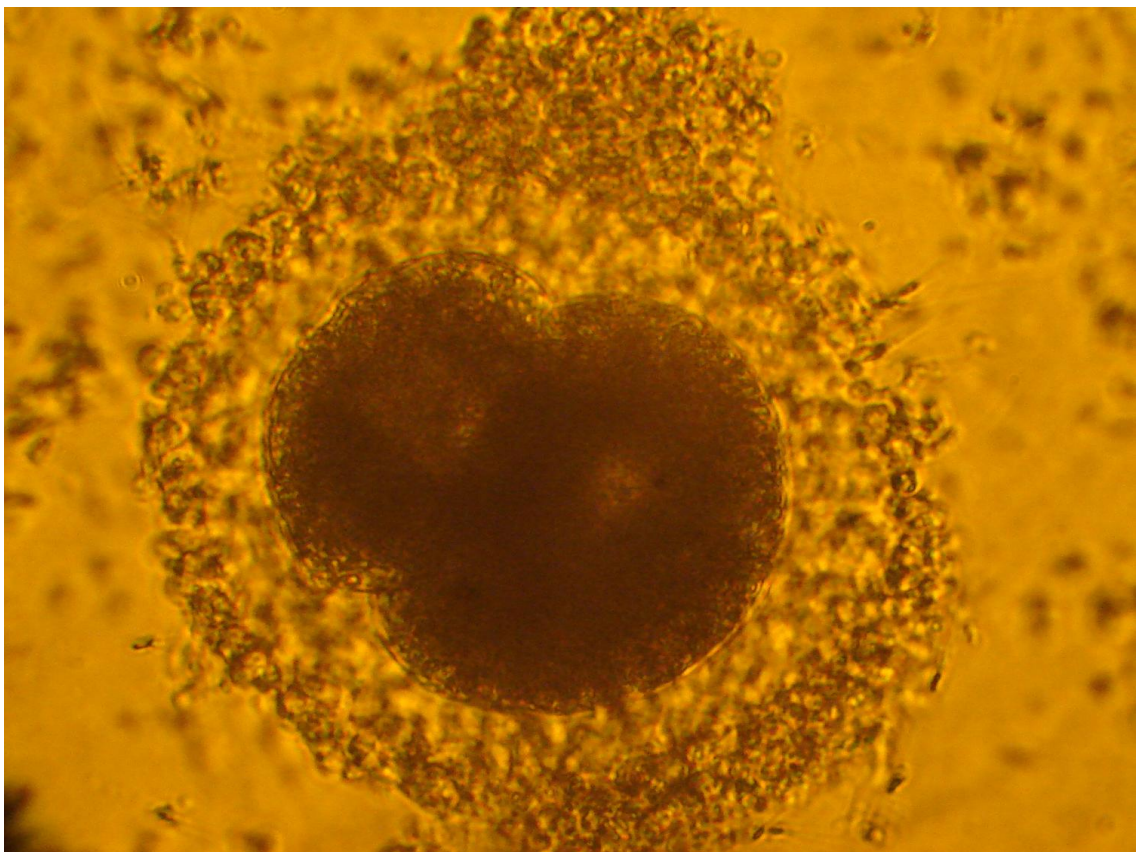


Figura 16. Segmentación del cigoto a los 72 horas obtenido en Medio Fert-Talp luego que el ovocito haya madurado en Medio IVF.

Mediante el Test Chi-cuadrado se determinó que no existió asociación entre la fertilización y el grado de los COC ($p > 0.05$, **Tabla 3**), ni tampoco entre la fertilización y ambos medios utilizados (**Tabla 4**) para la maduración de los ovocitos ($p > 0.05$). Mediante el Test de Proporciones se determinó que no existe diferencia significativa ($p > 0.05$) entre el número de ovocitos fertilizados con la procedencia del medio de cultivo en que maduraron dichos ovocitos (**Tabla K**) ya sea en Medio TCM-199 suplementado ($13/61 = 21.31\%$) como en Medio IVF suplementado ($6/28 = 21.43\%$). Estos resultados demuestran que el cultivo *in vitro* de ovocitos de alpaca en Medio IVF suplementado con hCG y estradiol permite obtener ovocitos maduros y fertilizados potencialmente viables.

Tabla 3. Asociación entre el grado del COC y la fertilización *in vitro* de ovocitos.

COC	Fertilización de ovocitos		Total
	No fertilizó	Fertilizó	
Grado 1	39	10	49
Grado 2	31	9	40
Total	70	19	89
Test Chi-cuadrado. Pr = 0.811			
No existe asociación ($p > 0.05$)			

**Tabla 4. Asociación entre el Medio de Maduración y la fertilización
in vitro de ovocitos.**

Medio de maduración	Fertilización de ovocitos		Total
	No fertilizó	Fertilizó	
TCM-199	48	13	61
IVF	22	6	28
Total	70	19	89
Test Chi-cuadrado. Pr = 0.990 No existe asociación ($p > 0.05$)			

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los sistemas de cultivo de ovocitos *in vitro* utilizados en otros animales domésticos han servido como modelos para los inicios de los cultivos de ovocitos en camélidos, el cual está comenzando a desarrollarse principalmente en llamas.

La colección de ovocitos provenientes de los folículos ováricos para llevar a cabo la maduración nuclear y citoplasmática es el primer paso para conseguir una tecnología reproductiva asistida. La morfología de los complejos cúmulus-ovocito (COC) es una característica importante como punto de partida para el inicio de la maduración del ovocito, donde un COC compacto por la densa capa de células que forman el cúmulus es el principal criterio para su evaluación (**Miragaya et al., 2006**). A pesar de no contar con un sistema de hiperestimulación ovárica en los animales de este estudio, se recuperaron 133 COC (84.18%) de los 158 COC (100%) obtenidos por el método de aspiración folicular utilizando ovarios de hembras de alpacas de Camal, siendo un buen porcentaje en comparación con lo reportado por **Ratto et al., 2005b** en llamas (71%) y por **Ratto et al., 2007** en alpacas (88%), aunque estos resultados fueron obtenidos con animales a los que se les realizó una hiperestimulación ovárica .

La expansión de las células del cúmulus y la expulsión del primer polar son características morfológicas de la maduración citoplasmática del ovocito (**Kruip et al., 1983**). Se encontró que el tiempo de ocurrencia de estos

eventos fue a partir de las 24 horas correlacionándose con los tiempos de maduración *in vitro* mostrados por **Ratto et al., 2005** en llamas (28 horas), por **Ratto et al., 2007** en alpacas (26 horas), y notoriamente más rápido a lo obtenido por **Del Campo et al., 1992 y Ratto et al, 1999** quienes encontraron la mayor cantidad de ovocitos maduros nuclearmente (metafase II) de llamas a las 32 y 36 horas de cultivo, respectivamente. Estos resultados son diferentes a los obtenidos en camellos donde la mayor cantidad de ovocitos en Metafase II fueron obtenidos después de las 36 horas (**Abdoon, 2001**).

La maduración citoplasmática se observó a las 26 horas de cultivo cuyo tiempo fue ligeramente menor a las estimaciones de tiempo en que ocurre la ovulación después de la cópula, los cuales van del rango de 26 a 42 horas (**San Martín et al., 1968**). Estos datos podrían sugerir que la maduración *in vitro* es independiente a la onda folicular, tal como fue encontrado en ovocitos de bovino por **Arlotto et al., 1996; Fukui y Sakuma, 1980** y posteriormente observado a nivel nuclear al encontrarse que la desintegración de la membrana nuclear previo a la Metafase II ocurre más rápido en ovocitos madurados *in vitro* que *in vivo* (**Hyttel et al., 1997**).

El porcentaje de la maduración citoplasmática de ovocitos *in vitro* con el Medio TCM-199 (71.76%) fue similar a lo observado en Medio IVF (70.45%), lo cual se relaciona con los resultados de maduración obtenidos en ovocitos de alpacas (70%) al realizar primero la maduración *in vivo* por superestimulación ovárica y posteriormente la maduración *in vitro* en TCM-199 (**Ratto et al., 2007**). Estos valores de maduración son menores a lo

encontrado por **Ratto et al., 2005** en la maduración de ovocitos de llamas, previo a una superestimulación ovárica. Por otra parte, estos resultados obtenidos superan a lo obtenido por **Miragaya et al., 2002** en la maduración *in vitro* de llamas, (62%) después de 30 horas de incubación y después de un tratamiento previo, también comparado a lo desarrollado por **Del Campo et al., 1992** en la maduración nuclear de ovocitos de llama, 62% a las 32 horas de cultivo y a los obtenidos por **Ratto et al., 1999** cuando la maduración *in vitro* de llama fue evaluada a las 26 horas de cultivo (58.2%) pero no cuando se evaluó a las 36 horas de cultivo (74.6%), estudios realizados luego de una superestimulación ovárica hormonal previa. Con esto se pone en evidencia el gran recurso genético que se pierde muchas veces en los camales cuando estos pueden ser fácilmente utilizados en sistemas de cultivo bien diseñados. El optar por un medio altamente enriquecido como es el Medio IVF sólo suplementado de hCG y estradiol garantiza el proceso de maduración *in vitro* de los ovocitos de alpaca.

Si bien es cierto que la densidad de las células del cúmulus facilita al ovocito en alcanzar la maduración nuclear y citoplasmática, son también necesarias las condiciones óptimas del cultivo para el logro de este fin. En este estudio se encontró la maduración citoplasmática, por la presencia del primer cuerpo polar expulsado (**Kruip et al., 1983**), de la mitad (2/4) de los COC de Grado 3 (ovocito con citoplasma irregular y con las capas de células de granulosa disgregadas) cultivados en Medio de cultivo IVF. Estos resultados se relacionan con lo descrito por **Zhang et al., 1995** quien encontró maduración nuclear (metafase II) de los ovocitos de bovino

madurados *in vitro* pero también demostró que esos ovocitos no fueron capaces de alcanzar la fertilización. Sin embargo, los ovocitos maduros que se obtuvo bajo estas características no pudieron ser fertilizados por la carencia de epidídimos en ese momento.

La tasa de maduración entre los COC de Grados 1 y 2 evaluados con ambos medios de cultivo en la maduración de ovocitos de alpacas fue similar, lo que explica que la presencia de células adyacentes al ovocito cumplen un rol crucial en la maduración al desencadenar una serie de señales químicas por la administración de sustancias exógenas, presentes en los medios de cultivo. En la suplementación del medio IVF, utilizado en humanos, se usó la gonadotrofina coriónica humana (hCG), glicoproteína funcionalmente análoga a la hormona luteinizante, que se está utilizando en procesos de maduración *in vitro* de ovocitos en diversas especies filogenéticamente diferentes. Se sabe que la función de la hormona luteinizante es reiniciar la meiosis en el folículo preovulatorio, desencadenando la ovulación y controlando el desarrollo y mantenimiento del cuerpo lúteo. Además la unión a receptores de membrana en las células de la granulosa y teca del folículo preovulatorio permite su acción **(Schuetz, 1974; Lacker et al., 1987)**. Produce un aumento del adenosin monofosfato cíclico (AMPc) vía adenilato ciclasa, provocando la activación del factor inductor de la maduración que cataliza la entrada a la fase meiótica Metafase I y II, previo a la fertilización **(Eppig y Downs; Eckberg, 1988; Heikinheimo y Gibbons, 1998; Schmitt y Nebreda, 2002)**. Asimismo esta hormona incrementa los niveles de plasmina haciendo que la procólagenasa se convierta en colagenasa y con ello se

rompe el colágeno de las células de la granulosa, disminuyendo la tensión superficial, lo cual provoca la expansión de las células del cúmulo (**Gigli et al., 2006**).

En la fertilización *in vitro* se encontró similaridad en la proporción de ovocitos fertilizados obtenidos a partir de los ovocitos madurados *in vitro* con el Medio TCM-199 y el Medio IVF, 13/61 y 6/28, respectivamente. Esto produjo tasas de fertilización de 21.31 y 21.43% observados por la segmentación del cigoto, evaluado a partir de las 48 de cultivo en Medio de cultivo Fert-TALP. Datos similares corroboran la viabilidad de los ovocitos madurados previamente en Medio IVF en comparación con el Medio TCM-199, medio utilizado generalmente en este tipo de cultivos. Los resultados obtenidos en este estudio son mejores en comparación al reportado por **Del Campo et al., 1994** con ovocitos de llamas obtenidas también a partir del Camal, donde el 15.8% de los ovocitos puestos a fertilizar, llegaron a segmentarse, durante el cultivo.

La fertilización *in vitro* realizada con Fert-TALP, medio de cultivo que tiene en su composición heparina y epinefrina (PHE) que activan a los espermatozoides, asegurando la motilidad de estos al momento de la fertilización. La tasa de fertilización es menor a lo encontrado por **Conde et al., 2008**, la cual fue del 40.8% cuando realizó la fertilización *in vitro* de ovocitos de llama con agentes de activación, de igual manera si comparamos a la técnica del ICSI realizada también con agentes de activación (36%).

El hecho que el 21% de los ovocitos madurados hayan llegado a segmentarse producto de la fertilización *in vitro* podría referir a que los ovocitos madurados (70.45% y 71.76%) son potencialmente viables a pesar de no haber sido evaluados por su maduración nuclear. Lo cual también hace sugerir el uso del medio de cultivo IVF para llevar a cabo la fertilización *in vitro* tal como se viene realizando en humanos.

El uso de gametos obtenidos a partir de camales puede convertirse en una fuente de material génico importante si este llega a utilizarse con ayuda de la Biotecnología Reproductiva. En este caso el uso de la maduración y fertilización *in vitro* en alpacas podría convertirse en una herramienta factible y confiable para el manejo reproductivo en esta especie.

CONCLUSIÓN

- El cultivo *in vitro* de ovocitos de alpaca en Medio IVF suplementado con hCG y estradiol permite obtener ovocitos maduros y fertilizados potencialmente viables.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdoon ASS. Factors affecting follicular population, oocyte yield and quality in camels (*Camelus dromedarius*) ovary with special reference to maturation time in vitro. *Animal Reproduction Science*. 2001;66(1-2):71-79.

Adam CL, Moir CE, Shiach P. Plasma progesterone concentrations in pregnant and non-pregnant llamas *Lama glama*. *The Veterinary Record*. 1989;125(25):618-620.

Adams GP, Griffin PG, Ginther OJ. In situ morphologic dynamics of ovaries, uterus and cervix in llamas. *Biology of Reproduction*. 1989;41(3):551-558.

Adams GP, Ratto MH, Huanca W, Singh J. Ovulation-inducing factor in the seminal plasma of alpacas and llamas. *Biology of Reproduction*. 2005;73(3):452-457.

Aller JF, Rebuffi GE, Cancino AK. Superovulation response to progesterone-eCG treatment in vicuna (*Vicugna vicugna*) in semicaptive conditions. *Theriogenology*. 2002a;57(1):576.

Aller JF, Rebuffi GE, Cancino AK, Alberio R. Successful transfer of vitrified llama (*Lama glama*) embryos. *Animal Reproduction Science*. 2002b;73(1-2):121-127.

Araínga M, Leyva V, García W, Franco E. Efecto de la GnRH en el proceso del reconocimiento maternal de la preñez sobre la supervivencia embrionaria en alpacas. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 2003;14(2):104-110.

Arlotto T, Schwartz JL, First NL, Leibfried Rutledge ML. Aspects of follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology*. 1996;45(5):943-956.

Bavister BD, Yanagimachi R. The effects of sperm extracts and energy sources on the motility and the acrosome reaction of hamster spermatozoa in vitro. *Biology of Reproduction*. 1977;16(2):228-237.

Bourke DA, Adam CL, Kyle CE. Ultrasonography as an aid to controlled breeding in the llama *Lama glama*. *The Veterinary Record*. 1992a;130(19):424-428.

Bourke DA, Adam CL, Kyle CE, McEvoy TG, Young P. Ovulation, superovulation and embryo recovery in llamas. *Proceedings of the 12th International Congress on Animal Reproduction*; August 23–27; The Hague; 1992b.

Bourke DA, Kyle CE, McEvoy TG, Young P, Adam CL. Superovulatory responses to eCG in llamas (*Lama glama*). *Theriogenology*. 1995a;44(2):255-268.

Bourke DA, Kyle CE, McEvoy TG, Young P, Adam CL. Recipient synchronization and embryo transfer in South American camelids. *Theriogenology*. 1995b;43(1):171.

Bravo PW, Fowler ME, Stabenfeldt GH, Lasley BL. Ovarian follicular dynamics in the llama. *Biology of Reproduction*. 1990a;43(4):579-585.

Bravo PW, Fowler ME, Stabenfeldt GH, Lasley B. Endocrine responses in the llama to copulation. *Theriogenology*. 1990b;33(4):891–899.

Bravo PW, Stabenfeldt GH, Lasley BL, Fowler ME. The effect of ovarian follicle size on pituitary and ovarian responses to copulation in domesticated south american camelids. *Biology of Reproduction*. 1991;45(4):553-559.

Bravo PW, Stabenfeldt GH, Fowler ME, Lasley BL. Pituitary response to repeated copulation and/or gonadotroping-releasing hormone administration in llamas and alpacas. *Biology of Reproduction*. 1992;47(5):884-888.

Bravo PW, Solis P, Ordoñez C, Alarcón V. Fertility of the male alpaca: effect of daily consecutive breeding. *Animal Reproduction Science*. 1997;46(3-4):305-312.

Bravo PW, Pacheco C, Quispe G, Vilcapaza L, Ordoñez C. Degelification of alpaca semen and the effect of dilution rates on artificial insemination outcome. *System Biology in Reproductive Medicine*. 1999;43(3):239–246.

Bravo PW, Skidmore JA, Zhao XX. Reproductive aspects and storage of semen in camelidae. *Animal Reproduction Science*. 2000a;62(1-3):173–193.

Bravo PW, Ccallo M, Garnica J.. The effect of enzymes on semen viscosity in llamas and alpacas. *Small Ruminant Research*. 2000b;38(1):91–95.

Brown BW. A review on reproduction in south american camelids. *Animal Reproduction Science*. 2000;58(3-4):169-195.

Calderón W, Sumar J, Franco E. Avances de la inseminación artificial de las alpacas (*Lama pacos*). *Revista Facultad Medicina Veterinaria Universidad Nacional Mayor de San Marcos*. 1968;22:19-35.

Conde PA, Herrera C, Trasorras VL, Giulano SM, Director A, Miragaya MH, et al. In vitro production of llama (*Lama glama*) embryos by IVF and ICSI with fresh semen. *Animal Reproduction Science*. 2008;109(1-4):298-308.

Davison IM. Fibre science and technology: lessons from the wool industry. *Proccedings Alpaca Conference*; 7th November; Australia; 1998.

Del Campo MR, Donoso MX, Del Campo CH, Rojo R, Barros C, Parrish JJ, Mapletoft RJ. In vitro maturation of llama (*Lama glama*) oocytes. *Proceedings of the 12th International Congress on Animal Reproduction*; August 23–27; The Hague; 1992. p. 324-326.

Del Campo MR, Del Campo CH, Donoso X, Berland M, Mapletoft R. In vitro fertilization and development of llama (*Lama glama*) oocytes using epididymal spermatozoa and oviductal cell co-culture. Theriogenology. 1994;41(6):1219-1229.

Eckberg WR. Intracellular signal transduction and amplification mechanisms in the regulation of oocyte maturation. The Biological Bulletin. 1988;174:95-108.

Eppig JJ, Downs SM. Chemical signals that regulate mammalian oocyte maturation. Biology of Reproduction. 1984;30(1):1-11.

Fernández-Baca S, Novoa C. Primer ensayo de inseminación artificial (*Lama paco*) con semen de vicuña (*Vicugna vicugna*). Revista Facultad Medicina Veterinaria Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 1968;22:9.

Fernández-Baca S, Madden DHL, Novoa C. Effect of different mating stimuli on induction of ovulation in the alpaca. Journal of Reproduction and Fertility. 1970a;22(2):261–267.

Fernández-Baca S, Hansel W, Novoa C. Embryonic mortality in the alpaca. Biology of Reproduction. 1970b;3(2):243-251.

Fernández-Baca S, Hansell W, Saatman R, Sumar J, Novoa C. Differential luteolytic effects of right and left uterine horns in the alpaca. *Biology of Reproduction*. 1979;20(3):586–595.

Fernández-Baca S. Manipulation of reproductive functions in male and female New World camelids. *Animal Reproduction Science*. 1993;33(1-4):307–323.

Fernandez-Baca S. Genetic erosion of camelidae. *Animal Genetic Resources Information (FAO/UNEP)*. 1995;14, 97–105.

Ferrer MS, Agüero A, Chaves MG, Russo AF, Rutter B. Sincronización de la onda folicular mediante el uso de buserelina en la llama (*Lama glama*). *InVet*. 2002;4(1):7-11.

Fukui Y, Sakuma Y. Maturation of bovine oocytes cultured in vitro: relation to ovarian activity, follicular size and the presence or absence of cumulus cells. *Biology of Reproduction*. 1980;22(3):669-73.

Gigli I, Russo A, Agüero A. Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos. *InVet*. 2006;8(1):1-22.

Gomez G, Ratto MH, Berland M, Wolter M, Adams GP. Superstimulatory response and oocyte collection in alpacas. *Theriogenology*. 2002;57(1):584.

Heinkinen O, Gibbons E. The molecular mechanisms of oocyte maturation and early embryonic development are unveiling new insights into reproductive medicine. *Molecular Human Reproduction*. 1998;4(8):745-756.

Huanca W, Gauly M. Conservación de semen refrigerado de llamas. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 2001;1:460-461.

Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 1997;47(1):23-32.

Knight TW, Death AF, Wyeth TK. Photoperiodic control of the time of parturition in alpacas (*Lama pacos*). *Animal Reproduction Science*. 1995;39(4):259-265.

Kruip T, Cran D, Van Beneden T, Dieleman S. Structural changes in bovine oocytes during final maturation in vitro. *Gamete Research*. 1983;8(1):29-47.

Lacker HM, Beers WH, Meuli LE, Akin E. A theory of follicles selection: I. Hypotheses and examples. *Biology of Reproduction*. 1987;37(3):570-580.

Lattanzi M, Santos C, Chaves MG, Miragaya MH, Capdevielle EF, Egey J, Agüero A, Barañao JL. Cryopreservation of llama (*Lama glama*) embryos by slow freezing and vitrification. *Theriogenology*. 2002;57(1):585.

Leyva V, Sumar J. Evaluacion del peso corporal al empadre sobre la capacidad reproductiva de hembras alpaca de un año de edad. Proceedings of the IV Convención Internacional sobre Camelidos Sudamericanos; 22–27 Noviembre; Punta Arenas-Chile; 1981.

McEvoy TG, Kyle CE, Slater D. Collection, evaluation and cryopreservation of llama semen. Journal of Reproduction and Fertility. 1992;9:81.

Miragaya MH, Chaves MG, Capdevielle EF, Ferrer MS, Pinto MR, Rutter B, Neild DM, Rutter B. In vitro maturation of llama (*Lama glama*) oocytes obtained surgically using follicle aspiration. Theriogenology. 2002;57(1):731.

Miragaya MH, Chaves MG, Agüero A. Reproductive biotechnology in south American camelids. Small Ruminant Research. 2006;61(2-3):299-310.

Novoa C, Sumar J, Franco E. Empadre complementario de hembras alpacas vacías. IV Boletín Extraordinario IVITA-UNMSM. 1970;4:53–59.

Novoa C, Franco E, García W, Pezo D. Dosis de gonatropinas (eCG y hCG), superovulación y obtención de embriones en alpacas. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. 1999;10(1):48-53

Palasz AT, Adams GP, Brogliatti GM, Mapletoft RJ. Effect of day of collection and of permeating cryoprotectants on llama (*Lama glama*) embryos and trophoblastic vesicles. Theriogenology. 2000;53(1):341.

Paolicchi F, Urquieta B, Del Valle L, Bustos-Obregón E. Biological activity of the seminal plasma of alpacas: stimulus for the production of LH by pituitary cells. *Animal Reproduction Science*. 1999;54(3):203-210.

Pollard JC, Littlejohn RP, Moore GH. Seasonal and other factors affecting the sexual behaviour of alpacas. *Animal Reproduction Science*. 1995;37(3-4):349-356.

Raggi LA, Ferrando G, Parraguez VH, MacNiven V, Urquieta B. Plasma progesterone in alpaca *Lama pacos* during pregnancy, parturition and early postpartum. *Animal Reproduction Science*. 1999;54(4):245-249.

Ratto MH, Gomez C, Wolter M, Berland M, Adams GP. Superstimulatory response and oocyte collection in alpacas. *Proceedings of the II Congreso Mundial sobre Camélidos*; Cuzco-Perú; 1999; 96.

Ratto MH, Huanca W, Singh J, Adams GP. Local versus systemic effect of ovulation-inducing factor in the seminal plasma of alpacas. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2005a;3:29-33.

Ratto M, Berland M, Huanca W, Singh J, Adams GP. In vitro and in vivo maturation of llama oocytes. *Theriogenology*. 2005;63(9):2445-2457.

Ratto M, Gomez C, Berland M, Adams GP. Effect of ovarian superstimulation on COC collection and maturation in alpacas. *Animal Reproduction Science*. 2007;97(3-4):246-256.

San Martín M, Copaira M, Zuniga J, Rodríguez R, Bustinza G, Acosta L. Aspects of reproduction in the alpaca. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1968;16(3):395–399.

Sansinena MJ, Taylor SA, Taylor PJ, Denniston RS, Godke RA. Production of nuclear transfer llama (*Lama glama*) embryos from in vitro matured llama oocytes. *Cloning Stem Cells*. 2003;5(3):191–198.

Schalm OW. Normal values in blood of laboratory, fur-bearing and miscellaneous zoo and wild animals. *Veterinary Hematology*. 2nd ed. Lea & Febiger; Philadelphia; 1967.

Schjeide OA, Gales F, Grellert EA, I-San Lin R, De Vellis J, Mead JF. Macromolecules in oocyte maturation. *Biology of Reproduction* 1970;2:14-43.

Schmitt A, Nebreda A. Signalling pathways in oocyte meiotic maturation. *Journal of Cell Science*. 2002;115:2457-2459.

Schuetz A. Role of hormones in oocyte maturation. *Biology of Reproduction*. 1974;10(2):150-178.

Smith CL., Peter AT, Pugh DG. Reproduction in llamas and alpacas: a review. *Theriogenology*. 1994;41(3):573–592.

Stanley HF, Kadwell M, Wheeler JC. Molecular evolution of the family Camelidae - a mitochondrial DNA study. *Proceedings Royal Society of London*; 1994; Ser. B. 256,1-6.

Sumar J, Franco E. Informe final IVITA-La Raya. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; Lima-Perú; 1974.

Sumar J. Reproductive physiology in South American Camelids. In: Land RB, Robinson DW. Eds. *Genetics of Reproduction in Sheep*; London; 1985; p. 81–95.

Sumar J. Removal of the ovaries or ablation of the corpus luteum and its effect on the maintenance of gestation in the alpaca and llama. *Acta Vet Scand* 1988;83:133-141.

Sumar JB. Reproduction in llamas and alpacas. *Animal Reproduction Science*. 1996;42(1-4):405-415.

Taylor KM, Hungerford DA, Snyder RL, Ulmer FA Jr. Uniformity of karyotypes in the Camelidae. *Cytogenic and Genome Research*. 1968;7(1):8–15.

Vaughan J, Galloway D, Hopkins D. Artificial insemination in alpacas (*Lama pacos*). Publication Nº. 03/104: Rural Industries Research and Development Corporation; Australia; 2003.

Vaughan JL, Macmillan KL, D'Occhio MJ. Ovarian follicular wave characteristics in alpacas. *Animal Reproduction Science*. 2004;80(3-4):353-361.

Wheeler JC. Evolution and present situation of the south american camelidae. *Biological Journal of the Linnean Society*. 1995;54(3):271-295.

Wilson Wiepz D, Chapman RJ. Non-surgical embryo transfer and live birth in a llama. *Theriogenology*. 1985;24(2):251–257.

Zhang L, Jiang S, Wozniak PJ, Yang X, Godke RA. Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development in vitro. *Molecular Reproduction and Development*. 1995;40(3): 338-44.

ANEXOS

Tabla A. Medio de Maduración TCM-199 suplementado

Componentes	Concentración Final	Volumen Final
TCM-199 (Sigma M5017, USA)*	90%	9 ml
Suero fetal bovino (Gibco 16000, USA)	10%	1 ml
Hormona folículo estimulante (Sigma F8174, USA)	0.02 UI/ml	10 µl (stock)
Piruvato de sodio (Sigma P5280, USA)	0.2 mM	20 µl (stock)
Gentamicina (Farindustria)	50 µg/ml	10 µl (stock)
17β-estradiol (Sigma E8875, USA)	1 µg/ml	10 µl (stock)

*** Reconstituir en Agua destilada y estéril (W3500)**

Stock de FSH: 20 UI FSH/1000µl de suero fisiológico

Stock de piruvato de sodio: 11 mg ácido pirúvico/1000µl de suero fisiológico

Stock de gentamicina: 50 mg de sulfato de gentamicina/1000µl de suero fisiológico

Stock de estradiol: 5mg de 17β-estradiol/5000µl de etanol absoluto

Tabla B. Composición del Medio TCM-199

Componente	Cantidad (g/L)
Sales inorgánicas	
CaCl ₂ (anhidro)	0.2
Fe(NO ₃) ₃ × 9H ₂ O	0.00072
MgSO ₄ (anhidro)	0.09767
KCl	0.4
KH ₂ PO ₄	---
Na . Acetate (anhidro)	0.05
NaHCO ₃	---
NaCl	6.8
Na ₂ HPO ₄ (anhidro)	---
NaH ₂ PO ₄ (anhidro)	0.122
Aminoácidos	
L-Alanina	0.025
L-Arginina · HCl	0.07
L-Ácido Aspártico	0.03
L-Cisteina · HCl · H ₂ O	0.00011
L-Cistina · 2HCl	0.026
L-Ácido Glutámico	0.0668
L-Glutamina	0.1
Glicina	0.05
L-Histidina · HCl · H ₂ O	0.02188
Hidroxi-L-Prolina	0.01
L-Isoleucina	0.02
L-Leucina	0.06
L-Lisina · HCl	0.07
L-Metionina	0.015
L-Fenilalanina	0.025
L-Prolina	0.04
L-Serina	0.025
L-Treonina	0.03
L-Triptofano	0.01
L-Tirosina · 2Na · 2H ₂ O	0.05766
L-Valina	0.025
Vitaminas	
Ácido Ascórbico · Na	0.0000566
D-Biotina	0.00001
Calciferol	0.000001
Cloruro de colina	0.0005
Ácido Fólico	0.00001
Menadiona (bisulfito de sodio)	0.000016
<i>myo</i> -Inositol	0.00005
Niacinamida	0.000025
Ácido Nicotínico	0.000025
Ácido <i>p</i> -Amino Benzoico	0.00005
Ácido D-Pantoténico · ½Ca	0.00001
Piridoxal · HCl	0.000025
Piridoxina · HCl	0.000025
Retinol Acetato	0.00014

Riboflavina	0.00001
DL- α -Tocoferol Fosfate · Na	0.00001
Tiamina · HCl	0.00001
Otros componentes	
Adenina Sulfato	0.01
Adenosina Trifosfato · 2Na	0.001
Adenosina Monofosfato · Na	0.0002385
Colesterol	0.0002
Desoxiribose	0.0005
Glucosa	1.0
Glutaciona (reduced)	0.00005
Guanina · HCl	0.0003
HEPES	-----
Hipoxantina	0.0003
Rojo de Fenol · Na	0.0213
TWEEN 80	0.02
Ribosa	0.0005
Timina	0.0003
Uracilo	0.0003
Xantina · Na	0.000344
Suplementado con	
L-Glutamine	
NaHCO ₃	2.2
Gramos requeridos para preparar 1 L: 9.5	

Tabla C. Medio de Maduración IVF suplementado

Componentes	Concentración Final	Volumen Final
Universal Medio IVF (MediCult 10310060, Dinamarca)	89.90%	8990 µl
Gonadotrofina coriónica humana (Coriomek-5000) (BBT Biotech, BE-00447, Alemania)	10 UI/ml	20 µl (stock)
17β-estradiol (Sigma E2758, USA)	99 µg/ml	990 µl (stock)

Stock de hCG: 5000 UI de hCG/1000 µl de suero fisiológico

Stock de estradiol: 1mg de 17β-estradiol/1000 µl de etanol absoluto

Tabla D. Composición del Universal Medio IVF

Componente	Cantidad
Reemplazo de suero sintético (incluye insulina recombinante humana)	(no indica, reservado)
HSA (Albúmina sérica humana)	(no indica, reservado)
Glucosa	(no indica, reservado)
Sales fisiológicas	(no indica, reservado)
Bicarbonato de sodio	(no indica, reservado)
Penicilina	50 000 UI/L
Estreptomicina	50 mg/L
Rojo de fenol	(no indica, reservado)

Tabla E. Medio Sperm-Talp (Medio de lavado y capacitación de espermatozoides)

Componentes	(mM)	mg/100ml	Stock sales (μl)
NaCl (Sigma S5886, USA)	100	584.4	2500 μl, 4M
KCl (Sigma P3911, USA)	3.1	23.1	310 μl, 1M
NaHCO ₃ (Sigma S8875, USA)	25	210	
NaH ₂ PO ₄ (Sigma S5011, USA)	0.3	3.6	300 μl, 0.1M
Lactato de Na (Sigma L4263, USA)	21.6	368 μl	
CaCl ₂ x 2H ₂ O (Sigma C7902, USA)	2	29.4	200 μl, 1M
MgCl ₂ x 6H ₂ O (Sigma M2670, USA)	0.4	8.1	399 μl, 0.1M
Hepes (Sigma H3375, USA)	10	238	
Rojo de Fenol (Sigma P0290, USA)	---	1%(100 μl); 0.5%(200 μl)	

Titular pH = 7.4 Mantener refrigerado (15 a 30 días)

Suplementos para 10ml de Medio:

- 1. Piruvato de sodio 1 mM (Sigma P5280, USA); 10 μl del stock**
- 2. Gentamicina (Farminindustria): 10 μl del stock**
- 3. BSA Fracción V (Sigma 85040C): 6mg/ml**

Filtrar con filtro de 0.22 μm (Millipore SLGVO33RS)

Temperar antes de usar

Tabla F. Medio Hepes-Talp (Medio de lavado de los ovocitos)

Componentes	(mM)	mg/100ml	Stock sales (μl)
NaCl (Sigma S5886, USA)	114	666	2849 μl, 4M
KCl (Sigma P3911, USA)	3.2	23.8	319 μl, 1M
NaHCO ₃ (Sigma S8875, USA)	2	16.8	
NaH ₂ PO ₄ (Sigma S5011, USA)	0.4	4.8	400 μl, 0.1M
Lactato de Na (Sigma L4263, USA)	10	187 μl	
CaCl ₂ x 2H ₂ O (Sigma C7902, USA)	2	29.4	200 μl, 1M
MgCl ₂ x 6H ₂ O (Sigma M2670, USA)	0.5	10	492 μl, 0.1M
Hepes (Sigma H3375, USA)	10	238	
Rojo de Fenol (Sigma P0290, USA)	---	1%(100 μl); 0.5%(200 μl)	

Titular pH = 7.4 Mantener refrigerado (15 a 30 días)

Suplementos para 10ml de Medio:

- 1. Piruvato de sodio 0.2 mM (Sigma P5280, USA); 10 μl del stock**
- 2. Gentamicina (Farminindustria): 10 μl del stock**
- 3. BSA Fracción V (Sigma 85040C): 30mg**

Filtrar con filtro de 0.22 μm (Millipore SLGVO33RS)

Temperar antes de usar

Tabla G. Medio Fert-Talp (Medio de Fertilización)

Componentes	(mM)	mg/100ml	Stock sales (μl)
NaCl (Sigma S5886, USA)	114	666	2849 μl, 4M
KCl (Sigma P3911, USA)	3.2	23.8	319 μl, 1M
NaHCO ₃ (Sigma S8875, USA)	2	210	
NaH ₂ PO ₄ (Sigma S5011, USA)	0.4	4.8	400 μl, 0.1M
Lactato de Na (Sigma L4263, USA)	10	187μl	
CaCl ₂ x 2H ₂ O (Sigma C7902, USA)	2	29.4	200 μl, 1M
MgCl ₂ x 6H ₂ O (Sigma M2670, USA)	0.5	10	492 μl, 0.1M
Hepes (Sigma H3375, USA)	----	-----	
Rojo de Fenol (Sigma P0290, USA)	---	1%(100μl); 0.5%(200μl)	

Titular pH = 7.8 Mantener refrigerado (15 a 30 días)

Suplementos para 10ml de Medio:

- 1. Piruvato de sodio 0.2 mM (Sigma P5280, USA): 10 μl del stock**
- 2. Gentamicina (Farminindustria): 10 μl del stock**
- 3. BSA libre de ácidos grasos (Sigma 85041C): 6mg/ml**

Filtrar con filtro de 0.22 μm (Millipore SLGVO33RS)

Temperar antes de usar y agregar heparina y PHE

Tabla H. Maduración *in vitro* de ovocitos en Medio TCM-199 y Medio IVF.

Two-sample test of proportion					TCM-199: Number of obs =	85
					IVF: Number of obs =	44
Variable	Mean	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]	
TCM-199	.7176471	.048825			.6219518	.8133423
IVF	.7045455	.0687818			.5697356	.8393553
diff	.0131016	.0843494			-.1522201	.1784233
	under Ho:	.0839971	0.16	0.876		
diff = prop(TCM-199) - prop(IVF)					z =	0.1560
Ho: diff = 0						
Ha: diff < 0		Ha: diff != 0		Ha: diff > 0		
Pr(Z < z) = 0.5620		Pr(Z < z) = 0.8761		Pr(Z > z) = 0.4380		

No hay diferencia significativa entre ambos Medios de Maduración ($p > 0.05$)

Tabla I. Maduración *in vitro* de ovocitos en Medio TCM-199 en relación al grado del COC.

Two-sample test of proportion					COC-Grado 1: Number of obs =	43
					COC-Grado 2: Number of obs =	42
Variable	Mean	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]	
COC-Grado 1	.744186	.0665378			.6137743	.8745978
COC-Grado 2	.6904762	.071334			.5506641	.8302883
diff	.0537099	.0975491			-.1374829	.2449026
	under Ho:	.0976567	0.55	0.582		
diff = prop(COC-Grado 1) - prop(COC-Grado 2)					z =	0.5500
Ho: diff = 0						
Ha: diff < 0		Ha: diff != 0		Ha: diff > 0		
Pr(Z < z) = 0.7088		Pr(Z < z) = 0.5823		Pr(Z > z) = 0.2912		

No hay diferencia significativa entre ambos Grados de los COC ($p > 0.05$)

Tabla J. Maduración *in vitro* de ovocitos en Medio IVF en relación al grado del COC.

Two-sample test of proportion			COC-Grado 1: Number of obs = 25		
			COC-Grado 2: Number of obs = 19		
Variable	Mean	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
COC-Grado 1	.72	.0897998			.5439957 .8960043
COC-Grado 2	.6842105	.1066392			.4752015 .8932195
diff	.0357895	.1394128			-.2374545 .3090335
	under Ho:	.1388607	0.26	0.797	
diff = prop(COC-Grado 1) - prop(COC-Grado 2)			z =		0.2577
Ho: diff = 0					
Ha: diff < 0		Ha: diff != 0		Ha: diff > 0	
Pr(Z < z) = 0.6017		Pr(Z < z) = 0.7966		Pr(Z > z) = 0.3983	
No hay diferencia significativa (p > 0.05)					

Tabla K. Fertilización *in vitro* de ovocitos en relación a la maduración en Medio TCM-199 y Medio IVF.

Two-sample test of proportion			TCM-199: Number of obs = 61		
			IVF: Number of obs = 28		
Variable	Mean	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
TCM-199	.2131148	.0524321			.1103497 .3158799
IVF	.2142857	.0775443			.0623017 .3662698
diff	-.001171	.0936069			-.1846371 .1822952
	under Ho:	.0935377	-0.01	0.990	
diff = prop(TCM-199) - prop(IVF)					z = -0.0125
Ho: diff = 0					
Ha: diff < 0		Ha: diff != 0		Ha: diff > 0	
Pr(Z < z) = 0.4950		Pr(Z < z) = 0.9900		Pr(Z > z) = 0.5050	
No hay diferencia significativa (p > 0.05)					



Figura A. *Vicugna pacos* "Alpacas" raza Huacaya del Camal Municipal de Huancavelica.



Figura B. Aparato reproductor hembra de *Vicugna pacos*



Figura C. Aspiración de los Complejos cúmulus-ovocito de los ovarios de *Vicugna pacos*. Nótese el bisel colocado hacia arriba